



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

ULB

# **Tryptophan-Metabolismus bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen : Biomarker für Inflammation und Karzinogenese**

Huhn, Meik  
(2021)

DOI (TUprints): <https://doi.org/10.12921/tuprints-00017215>

Lizenz:



CC-BY 4.0 International - Creative Commons, Namensnennung

Publikationstyp: Dissertation

Fachbereich: 10 Fachbereich Biologie

Quelle des Originals: <https://tuprints.ulb.tu-darmstadt.de/17215>

---



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

**Tryptophan-Metabolismus bei  
chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen:  
Biomarker für Inflammation und Karzinogenese**

---

**vom Fachbereich Biologie der  
Technischen Universität Darmstadt**

zur Erlangung des Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

**Dissertation**

**von Meik Huhn**

Erstgutachterin: Prof. Dr. Beatrix Süß

Zweitgutachter: Prof. Dr. Heinfried H. Radeke

Darmstadt, 2020

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2017 bis September 2020 im Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums der Goethe Universität Frankfurt am Main unter der Betreuung durch Prof. Dr. med. Heinfried H. Radeke in der Arbeitsgruppe Immunpharmakologie durchgeführt.

Huhn, Meik: Tryptophan-Metabolismus bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen  
Biomarker für Inflammation und Karzinogenese

Darmstadt, Technische Universität Darmstadt

Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUpriints: 2021

URN der Dissertation: urn:nbn:de:tuda-tuprints-172157

Tag der mündlichen Prüfung: 05. November 2020

Veröffentlicht unter CC-BY 4.0 International – Creative Commons, Namensnennung

Das Geheimnis des Glückes ist die Freiheit,  
und das Geheimnis der Freiheit ist der Mut.

Perikles (um 500 – 429 v. Chr.)

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>I</b>
1.1 Deutsche Zusammenfassung	I
1.2 Englische Zusammenfassung	III
<b>2. Einleitung</b>	<b>1</b>
2.1 Begriffserklärung: Entzündung oder Inflammation	1
2.2 Autoinflammation versus Autoimmunität	4
2.3 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	6
2.3.1 Subtypen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen	9
2.3.2 Problematik der Diagnostik bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen	11
2.3.3 Scoring-Systeme zur Befundung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen	13
2.4 Biomarker	15
2.4.1 Begriffserklärung Biomarker	15
2.4.2 Molekulare Biomarker zur Differenzierung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und Nutzen in der personalisierten Medizin	16
2.5 Immunmetabolismus: Von der Immunhomöostase zur Immunreprogrammierung	18
2.6 Tryptophanstoffwechsel	21
2.7 Tryptophanstoffwechsel und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	25
2.8 Fragestellung	26
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>27</b>
3.1 Material	27
3.1.1 Humanes Material von gesunden Probanden und Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen	27
3.1.1.1 Plasma-, Urin- und Stuhlproben aus dem Interdisziplinären Crohn Colitis Centrum Frankfurt – CED-Patientenkohorte-Frankfurt	27

3.1.1.2	Auswahlkriterien der Probanden und Patienten zur Akquise von humanen Plasma-, Urin- und Stuhlproben aus dem Interdisziplinären Crohn Colitis Centrum Frankfurt – CED-Patientenkohorte-Frankfurt .....	27
3.1.1.3	Ethikvotum – CED-Patientenkohorte-Frankfurt .....	28
3.1.1.4	Intestinale Gewebeproben der Pathologie Bayreuth – CED Patientenkohorte Bayreuth .....	28
3.1.1.5	Auswahlkriterien zur Akquise von humanen intestinalen Gewebeproben der Pathologie Bayreuth – CED-Patientenkohorte Bayreuth .....	29
3.1.1.6	Ethikvotum – CED-Patientenkohorte-Bayreuth .....	30
3.1.1.7	Auswahlkriterien zur Akquise von humanen intestinalen Gewebeproben von Krebspatienten des Universitären Centrums für Tumorerkrankungen Frankfurt .....	30
3.1.1.8	Ethikvotum – Universitäres Centrums für Tumorerkrankungen Frankfurt.	30
3.1.2	Murines Material .....	30
3.1.2.1	Tierstamm, Haltung und Präparation .....	30
3.1.2.2	Versuchstierantrag zur Akquise murinen Materials .....	31
3.1.3	Zellen .....	31
3.1.3.1	Intestinale Epithelzelllinien .....	31
3.1.3.1.1	CCD 841 CoN Zellen .....	31
3.1.3.1.2	CaCo-2 Zellen .....	32
3.1.3.1.3	DLD-1 Zellen .....	32
3.1.3.1.4	Primäre humane Immunzellen .....	32
3.1.4	Labormaterial .....	33
3.1.4.1	Antikörper .....	33
3.1.4.2	Interleukine und Stimuli .....	34
3.1.4.3	Kits .....	35
3.1.4.4	Quantitative mRNA Bestimmung (TaqMan Assay) .....	36
3.1.4.5	Medien und Puffer .....	37

3.1.4.6	Chemikalien .....	38
3.1.4.7	Geräte und Software .....	39
3.2	Methoden.....	41
3.2.1	Humane ex vivo Versuche.....	41
3.2.1.1	Erstellung der klinischen-endoskopischen Scores <i>Harvey-Bradshaw-Index</i> , <i>Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity</i> und <i>Mayo Score</i> zur Charakterisierung von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen – CED-Patientenkohorte Frankfurt.....	41
3.2.1.2	Erstellung der Montreal Klassifizierung zur Charakterisierung von Subtypen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen – CED-Patientenkohorte Frankfurt.....	42
3.2.1.3	Erstellung des Riley Scores zur Befundung humaner intestinaler Gewebeproben von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen – CED-Patientenkohorte-Bayreuth .....	43
3.2.1.4	Aufarbeitung und Lagerung von humanem Material .....	43
3.2.1.4.1	Plasma .....	44
3.2.1.4.2	Urin.....	44
3.2.1.4.3	Stuhl .....	44
3.2.1.4.4	Gewebe.....	45
3.2.1.5	Konzentrationsbestimmung von Tryptophan und Kynurenin in Plasma-, Urin- und Stuhlproben mittels ELISA.....	45
3.2.1.6	Konzentrationsbestimmung von Kynureninsäure, 3-Hydroxy- kynurenin, Anthranilsäure und 3-Hydroxyanthranilsäure in humanem Plasma mittels LC-MS/MS.....	45
3.2.1.7	Immunhistochemische Analysen von intestinalen Gewebeproben.....	45
3.2.1.8	Auswertung der immunhistochemischen Analysen von intestinalen Gewebeproben.....	47
3.2.1.9	Immunfluoreszenz intestinaler Gewebeproben .....	48
3.2.2	Murine ex vivo Versuche .....	49

3.2.2.1	Dextransulfat-Natrium-induzierte intestinale Entzündung bei C57BL/6 Mäusen .....	49
3.2.2.2	Aufarbeitung und Lagerung von murinem Plasma .....	49
3.2.2.3	Konzentrationsbestimmungen von Kynurenin und 3-Hydroxy-anthranilsäure in murinem Plasma mittels LC-MS/MS .....	50
3.2.3	Humane <i>in vitro</i> Versuche .....	51
3.2.3.1	Isolation und Kultivierung von Peripheren-Mononukleären-Blutzellen .....	51
3.2.3.2	Isolation von Monozyten, B Zellen, CD3+ T Zellen und CD8+ T Zellen ...	52
3.2.3.3	Generierung humaner Makrophagen .....	52
3.2.3.4	Generierung humaner Dendritischer Zellen .....	53
3.2.3.5	Kultivierung der intestinalen Zelllinien CCD 841 CoN, CaCo-2 und DLD-1 .....	53
3.2.3.6	Auftauen, Passagieren und Wegfrieren der intestinalen Zelllinien CCD 841 CoN, CaCo-2 und DLD-1 .....	53
3.2.3.7	Zellzahlbestimmung der primären Immunzellen und intestinalen Zelllinien .....	54
3.2.3.8	Stimulation der primären Immunzellen und intestinalen Zelllinien .....	55
3.2.3.9	RNA Isolation .....	55
3.2.3.10	Reverse Transkription der RNA und Generierung von komplementärer DNA.....	56
3.2.3.11	Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion .....	57
3.2.3.12	Analyse von Zelloberflächenmarkern und der intrazellulären IDO1 Expression in PBMCs und CD8+ T Zellen mittels Durchflusszytometrie ..	58
3.2.4	Statistik.....	59
4.	<b>Ergebnisse</b> .....	60
4.1	Untersuchung der CED-Patientenkohorte-Frankfurt .....	60
4.1.1	Charakterisierung der CED-Patientenkohorte-Frankfurt zur systemischen Analyse des Tryptophanstoffwechsels .....	60



4.1.2	Analyse des systemischen Tryptophanstoffwechsels der CED-Patientenkohorte-Frankfurt.....	62
4.2	Untersuchung von Tryptophanmetaboliten im murinen Modell der Dextransulfat-Natrium induzierten intestinalen Inflammation .....	64
4.2.1	Krankheitsverlauf.....	64
4.2.2	Systemische Kynurenin- und 3-Hydroxyanthranilsäurekonzentrations-Bestimmungen.....	66
4.3	Analyse des lokalen Tryptophanstoffwechsels der CED-Patientenkohorte Bayreuth mit aktiver intestinaler Inflammation .....	68
4.3.1	Charakterisierung der CED-Patientenkohorte-Bayreuth.....	68
4.3.2	Analyse des lokalen immunologischen Profils bei CED-Patienten .....	70
4.3.2.1	Antigenpräsentierende Zellen .....	70
4.3.2.2	Neutrophile Granulozyten.....	72
4.3.2.3	T Lymphozyten.....	73
4.3.2.4	Zusammenfassung des CED-Subtypen spezifischen immunologischen Profils bei Patienten mit aktiver Inflammation.....	75
4.3.3	Analyse des lokalen Expressionsprofils von Enzymen des Tryptophanstoffwechsels bei CED-Patienten mit aktiver Inflammation.....	77
4.3.4	Analyse der lokalen Kynurenin- und 3-Hydroxyanthranilsäureniveaus bei CED-Patienten.....	79
4.3.5	Zusammenfassung des lokalen Tryptophanstoffwechsels bei Ileum-assoziiertem Morbus Crohn.....	81
4.3.6	Schema zur Klassifizierung von CED-Subtypen mit Hilfe des Tryptophanstoffwechsels und immunhistochemischen-Analysen.....	82
4.4	Entzündungsinduziertes Einzelzellscreening der Tryptophanstoffwechselenzyme und Tryptophanmetabolite in Zelltypen des Immunsystems und des intestinalen Epitheliums .....	84
4.4.1	Antigenpräsentierende Zellen.....	84
4.4.2	M1 und M2 Makrophagen.....	87

4.4.3	Einzelzellanalyse der entzündungsinduzierten Produktion von Kynurenin und 3-Hydroxyanthranilsäure durch M1 und M2 Makrophagen .....	88
4.4.4	Intestinale Epithelzellen .....	89
4.4.5	Einzelzellanalyse der entzündungsinduzierten Produktion von Kynurenin durch intestinale Epithelzellen .....	92
4.5	Nachweis der Indolamin-2,3-Dioxygenase 1 Proteinexpression in systemischen und lokalen T Zellen .....	94
4.6	Analyse der entzündungsinduzierten Regulation des potenziellen Zielgenes von Kynurenin dem Arylhydrocarbonrezeptor.....	96
5.	<b>Diskussion</b> .....	98
5.1	Analyse des systemischen Tryptophanstoffwechsels .....	99
5.1.1	Tryptophanstoffwechsel bei CED-Patienten in Remission.....	99
5.1.2	Muriner Tryptophanstoffwechsel.....	101
5.2	Lokaler Tryptophanstoffwechsel bei CED-Patienten im Schub.....	104
5.3	Einzelzellscreening des Tryptophanstoffwechsels.....	113
5.4	Fazit.....	119
6.	<b>Literatur</b> .....	121
7.	<b>Supplements</b> .....	144
7.1	Konzentrationsbestimmungen von Tryptophan, Kynurenin und Kynureninsäure in Urin- und Stuhlproben von CED-Patienten in Remission .....	144
7.2	Dextransulfat-Natrium induzierter Gewichtsverlust von C57BL/6 Mäusen....	145
7.3	Erweitertes Material der immunhistochemischen-Analysen des lokalen Tryptophanstoffwechsels bei CED-Patienten im Schub.....	146
7.3.1	Beispiel zur Anfertigung sequentieller immunhistochemischer-Färbungen	146
7.3.2	Vorgehen zur Auswertung der immunhistochemischen-Färbungen .....	147
7.3.3	Negativkontrollen.....	148
7.3.4	Immunhistochemische-Analyse der Tryptophan-2,3-Dioxygenase Proteinexpression in intestinalen Gewebeproben von CED-Patienten im Schub .....	149

7.3.5	Korrelationen der immunhistochemischen-Analysen von Enzymen und Metaboliten des Tryptophanstoffwechsels sowie Immunzellmarkern der CED-Patientenkohorte-Bayreuth.....	150
7.3.5.1	Enzyme versus Immunzellen .....	150
7.3.5.2	Metabolite versus Immunzellen.....	150
7.3.5.3	Enzyme versus Enzyme.....	151
7.3.5.4	Enzyme versus Metabolite .....	152
7.4	Erweitertes Einzelzellscreening: Zuordnung von entzündungsinduzierten Enzymexpressionen des TRP-Stoffwechsels zu Zelltypen des Immunsystems und des Epitheliums .....	153
7.4.1	M1 und M2 Makrophagen.....	153
7.4.2	T Zellen .....	154
8.	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	156
9.	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	161
10.	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	164
11.	<b>Danksagung</b> .....	166
12.	<b>Publikationen und Konferenzteilnahmen</b> .....	168
12.1	Publikationen .....	168
12.2	Konferenzteilnahmen.....	168
13.	<b>Curriculum Vitae</b> .....	170
14.	<b>Schriftliche Erklärung</b> .....	172

## 1. Zusammenfassung

### 1.1 Deutsche Zusammenfassung

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, wie die beiden wesentlichen pathophysiologischen Formen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, sind persistierende gastrointestinale Erkrankungen, die auf einer überschießenden Immunantwort mit einem Ungleichgewicht von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen basieren. Eine Verbesserung der Symptomatik kann mit antientzündlichen, immunsuppressiven Medikamenten und Biopharmazeutika, aber oft leider nur mit chirurgischen Maßnahmen erreicht werden. Die diagnostische Abgrenzung von Colitis ulcerosa und Morbus Crohn hat sich durch die Charakterisierung neuer Biomarker zwar verbessert, trotzdem treten in der Klinik Fälle auf, die eine genaue Identifikation des Phänotyps und die Wahl einer spezifischen individuellen Therapie erschweren. Aktuelle Studien zeigen, dass die Berücksichtigung der Lokalisation der Inflammation entlang des gastrointestinalen Traktes essenziell für den Erfolg einer Therapie ist. Die Identifikation eines Biomarkers, der eine differenzierte Diagnose von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen relevanten Subtypen zulässt, wäre daher von großer Bedeutung. Vielversprechend sind kürzliche Beobachtungen eines differenziell veränderten Tryptophanstoffwechsels mit verminderten systemischen Tryptophankonzentrationen. Tryptophanmetabolite sind als biologisch aktive Moleküle beschrieben, die in Abhängigkeit vom Immunstatus sowohl anti- als auch proinflammatorisch wirken können. Ziel dieser Arbeit war es innerhalb des Tryptophanstoffwechsels einen Biomarker zu identifizieren, der eine eindeutige Differenzierung von Subtypen der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen erlaubt. Zudem sollten neue Zielstrukturen charakterisiert werden, die den Immunmetabolismus modellieren können, um die Progression von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen sowie eine mögliche Kanzerogenese zu verhindern. Mittels LC-MS/MS und ELISA erfolgte eine Untersuchung des systemischen Tryptophanstoffwechsels von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen sowie im murinen Modell der DSS Colitis. Die Analysen der Plasmaproben zeigten ein verändertes Tryptophanmetabolitprofil abhängig von der Stärke der Inflammation. Während Patienten in Remission kaum veränderte Tryptophanmetabolitwerte zeigten, war im murinen Colitis-Modell eine moderate und starke Inflammation von einer Aktivierung des Tryptophanstoffwechsels begleitet. Die moderate Inflammation verursachte ein Anstieg der

Kynureninkonzentration, wohingegen die starke Inflammation die Kynureninkonzentrationen abfallen ließ. Die starke Inflammation induzierte zusätzlich ein Abfall der Konzentration von 3-Hydroxyanthranilsäure, einem weiteren Folgemetaboliten von Kynurenin. Um den Einfluss der intestinalen Enzymexpressionen sowie die auftretenden Metabolitkaskaden zu untersuchen, erfolgte eine immunhistochemische Analyse des lokalen Tryptophanstoffwechsels bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen im Schub. Die Ergebnisse zeigten eine spezifische Biomarker-Signatur, die eine eindeutige Differenzierung der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung relevanten Subtypen Ileum-assoziiierter Morbus Crohn, Kolon-assoziiierter Morbus Crohn und Kolon-assoziierte Colitis ulcerosa möglich machten. Die immunhistochemische Bestimmung von Indolamin-2,3-Dioxygenase 1, Kynureninase und Kynurenin-3-Monooxygenase sowie das Verhältnis der Tryptophanmetabolite 3-Hydroxyanthranilsäure zu Kynurenin ermöglichte die eindeutige Differenzierung. Abschließende *in vitro* Versuche konnten erfolgreich Enzyme des Tryptophanstoffwechsels entweder den Zellen des Immunsystems oder des intestinalen Epithels zuordnen. Hierbei entstand ein neues komplexes und transzelluläres Schema, in welchem Antigenpräsentierende Zellen und Epithelzellen als Produzenten der Tryptophanmetabolite sowie Lymphozyten als Zielzellen charakterisiert wurden. Im Weiteren verdeutlichte eine ausbleibende mRNA Regulation der Kynureninase innerhalb der Analyse der intestinalen Krebszelllinien eine potenzielle Rolle in der Kanzerogenese von Kolonkarzinomen. Hierbei produzieren die intestinalen Krebszellen mittels der entzündungsinduzierten mRNA Expression von Indoleamin-2,3-Dioxygenase 1 und Tryptophan-2,3-Dioxygenase ein konstant hohes Niveau an Kynurenin, indem abwärts-gerichtete Enzyme vermindert exprimiert werden. Zusammenfassend erfolgte innerhalb dieser Arbeit die Identifikation einer mukosalen Biomarker-Signatur, welche mittels immunhistochemischen Analysen eine klare Abgrenzung der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung relevanten Subtypen Ileum-assoziiierter Morbus Crohn, Kolon-assoziiierter Morbus Crohn und Kolon-assoziierte Colitis ulcerosa gewährleistet. Zudem motivieren die Ergebnisse weiterführende Studien durchzuführen, die die Steuerung von lokalen Kynurenin und Kynurenin-abwärts-gerichteten Metaboliten innerhalb von chronisch-entzündlichen Erkrankungen untersuchen und darauf aufbauend potenzielle neue Therapieziele identifizieren.

## 1.2 Englische Zusammenfassung

Chronic inflammatory bowel diseases such as the two major pathophysiological entities, ulcerative colitis and Crohn's disease, are persistent gastrointestinal injuries based on an excessive immune response with an imbalance of pro- and anti-inflammatory cytokines. An improvement of symptoms is currently achieved with anti-inflammatory, immunosuppressive drugs or biopharmaceuticals. Unfortunately however, only surgical measures remain as last resort. Diagnostic differentiation of ulcerative colitis and Crohn's disease has improved due to the characterization of new biomarkers. Still patients present in the clinic whose phenotype of colitis is difficult to discern and hampers the right choice of a specific individual therapy. Recent studies show that consideration of the localization of inflammation along the gastrointestinal tract is essential for a successful therapy. The identification of a biomarker that allows a differentiated diagnosis of chronic inflammatory bowel disease relevant subtypes would therefore be of great importance. Recent observations of a differentially altered tryptophan metabolism with reduced systemic tryptophan concentrations are promising. Tryptophan metabolites are described as biologically active molecules that can act both anti-inflammatory and pro-inflammatory depending on the immune status. The aim of this work was to identify a biomarker within the tryptophan metabolism that allows a clear differentiation of subtypes of chronic inflammatory bowel diseases. In addition, new target structures were characterized which potentially modify the immune metabolism to prevent the progression of chronic inflammatory bowel diseases as well as a possible carcinogenic process. LC-MS/MS and ELISA were used to determine tryptophan metabolites in plasma of patients with chronic inflammatory bowel diseases and in a murine model of DSS colitis. The analysis revealed an altered tryptophan metabolite profile depending on the intensity of inflammation. While patients in remission hardly showed changes of the tryptophan metabolite levels, in the murine colitis model moderate and severe inflammation was accompanied by activation of tryptophan metabolism. The moderate inflammation caused an increase of the concentration of kynurenine, whereas a strong inflammatory challenge caused a decrease in the concentration of kynurenine. The strong inflammation additionally induced a decrease in the concentration of 3-hydroxyanthranilic acid, another metabolite of kynurenine. In order to investigate the influence of intestinal enzyme expression as well as the occurring metabolite cascades, an immunohistochemical

analysis of the local tryptophan metabolism in patients with chronic inflammatory bowel diseases during relapses was performed. The results showed a specific biomarker signature, which allowed a clear differentiation of the chronic inflammatory bowel disease relevant subtypes ileum-associated Crohn's disease, colon-associated Crohn's disease and colon-associated ulcerative colitis. The immunohistochemical determination of indoleamine 2,3-dioxygenase 1, kynureninase and kynurenine 3-monooxygenase as well as the ratio of tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid to kynurenine allowed a clear differentiation. Concluding *in vitro* experiments successfully demonstrated a preferential expression of enzymes of the tryptophan metabolism either in cells of the immune system or in intestinal epithelial cells. This finding allow to lay out a new complex and transcellular scheme in which antigen-presenting cells and epithelial cells act as producers of tryptophan metabolites whereas lymphocytes were characterized as target cells. Furthermore, the lack of mRNA regulation of kynureninase in the analysis of intestinal cancer cell lines revealed a potential role in the carcinogenesis of colon carcinomas. Here the colon cancer cells after inflammatory activation expressed indoleamine 2,3-dioxygenase 1 and tryptophan 2,3-dioxygenase mRNA allowing constantly high levels of kynurenin, which was supported by lower expression levels of downstream enzymes. In summary, the identification of a mucosal biomarker signature was successfully achieved within this thesis, which warrants a clear differentiation of the chronic inflammatory bowel disease relevant subtypes, ileum-associated Crohn's disease, colon-associated Crohn's disease and colon-associated ulcerative colitis, by immunohistochemical analyses. The results also motivate further studies to investigate the control of local kynurenine and kynurenine downstream metabolites within chronic inflammatory diseases and to identify potential new therapeutic targets.

## 2. Einleitung

### 2.1 Begriffserklärung: Entzündung oder Inflammation

Der menschliche Organismus verfügt über natürliche und erworbene Immunmechanismen, um adäquat auf schädliche Reize reagieren und das physiologische innere Gleichgewicht erhalten zu können. Bei diesen, durch die Interaktion von phagozytischen und adaptiven Immunzellen mit lokalen gewebsständigen Zellen hervorgerufenen Abwehrmechanismen, treten Begleiterscheinungen auf, die im allgemeinen Sprachgebrauch als Entzündung oder in der modernen Medizin als Inflammation (lat. *inflammare*: in Brand setzten) bezeichnet werden [1]. Anzeichen sind Merkmale wie Rötung (hervorgerufen durch Hyperämie), Schwellung (hervorgerufen durch erhöhte Permeabilität des Gefäßsystems und Austritt von Proteinen), Schmerz (hervorgerufen durch Veränderungen der Nervenendungen), Hitze (hervorgerufen durch den erhöhten Blutfluss und zellulären Mediatoren) und Funktionsverlust des betroffenen Gewebes [1-3]. Nicht nur das vom schädlichen Reiz betroffenen Organ ist von einer Inflammation betroffen, sondern auch umgebende Bindegewebe und Blutgefäße, das angrenzende Lymphsystem, sowie in vielen Fällen der Gesamtorganismus. Eine Inflammation ist gekennzeichnet durch die Blutstillung, die Blutgerinnung, die eigentliche Inflammation, das Abräumen von Zelltrümmern sowie die Wundheilung [4]. Eine Inflammation ist in Abhängigkeit der Lokalität und des zeitlichen Intervalls in Unterkategorien einzuordnen. Bei einer lokalen Inflammation ist lediglich ein Organ betroffen. Beispiele hierfür sind eine Gastritis (Entzündung Magen) oder eine Kolitis (Entzündung des Darms) [5]. Bei einer systemischen Inflammation ist dagegen der gesamte Organismus betroffen [5]. Zeitlich wird eine Inflammation in akut oder chronisch kategorisiert. Akut bedeutet, dass sich eine Inflammation innerhalb von Stunden bis Tagen komplett auflöst oder narbig abheilt [6]. Bei einer chronischen Inflammation hingegen, persistiert die Inflammation [6]. Dieser Prozess ist mit einer fehlerhaften Beseitigung des ursächlichen Reizes verbunden [7]. Beispiele sind die Rheumtoide Arthritis, Psoriasis, Diabetes mellitus, diverse Krebsarten aber auch chronisch-entzündliche Darmerkrankungen. Auslöser einer Inflammation sind schädliche Reize, welche mechanische (z.B. Druck), thermische (z.B. hohe Temperaturen), oder chemische (z.B. Säuren) aber auch Allergene und vor allem pathogene Krankheitserreger (u.a. Viren, Bakterien) beinhalten [5]. Eine Inflammation ist stark reguliert und unterliegt zeitlich ineinandergreifenden molekularen



Mechanismen sowie der Interaktion diverser Zelltypen des angeborenen und adaptiven Immunsystems mit lokalen gewebsständigen Zellen. Es ist ein grundlegendes Konzept mit vier Hauptakteuren zu beobachten: Den exogenen und endogenen Induktoren, den Sensoren sowie den Mediatoren und Effektoren [7]. Gewebsständige (*tissue-resident*) Immunzellen agieren als Sensoren auf exogene und endogene Induktoren. Als gewebsständigen Immunzellen sind lokal ansässige Makrophagen, Dendritische Zellen (DC), Lymphozyten und Mastzellen einzuordnen. Diese erkennen körperfremde aber auch eigene veränderte Zellstrukturen und initiieren die Eliminierung des Erregers oder der entarteten Zelle [8]. Bei den Zellstrukturen handelt es sich um *pathogen-associated molecular pattern* (PAMPs) von aufgenommenen pathogenen Erregern (exogene Induktoren) oder um *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) von defekten Zellen des eigenen Organismus (endogene Induktoren), welche durch spezifische Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) der gewebsständigen Immunzellen erkannt werden [9,10]. Als exogene Induktoren werden Zielstrukturen von mikrobiellen (u.a. Lipopolysaccharide von Bakterien) und nicht mikrobiellen Erregern bezeichnet (u.a. Allergene, toxische Verbindungen) [11–13]. Endogene Induktoren entstehen durch die Nekrose von Zellen. Hierbei werden Zielstrukturen frei, die durch eine Kompartimentierung innerhalb der Zellen räumlich getrennt sind. Treten diese aufgrund einer dysfunktionalen Membranintegrität aus der Zelle aus, wird die Aktivierung der Rezeptoren von gewebsständigen Immunzellen eingeleitet. Beispiele hierfür sind Adenosintriphosphat (ATP), Kaliumionen oder Harnsäure [14,15]. In dieser Phase der Entzündung spielen proinflammatorische Mediatoren eine essenzielle Rolle. Sie können in sieben Gruppen klassifiziert werden und beinhalten vasoaktive Amine, vasoaktive Peptide, Fragmente des Komplements, Lipidmediatoren, Zytokine, Chemokine und proteolytische Enzyme [16,17]. Die Ligation der PRRs mit den spezifischen PAMPs/DAMPs führt zu Mechanismen, welche die Endozytose des Erregers mit lysosomaler Degradation [18,19], die Aktivierung des *nuclear factor-kappa B* (NF $\kappa$ B) und *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Signalweges [20,21], Produktion von *reactive oxygen species* (ROS), sowie die Sezernierung von proinflammatorischen Zytokinen (u.a. Tumornekrosefaktor (TNF)  $\alpha$ , Interleukin (IL)-1, IL-6) und Lipidmediatoren (u.a. Chemokine, vasoaktive Amine und Eicosanoide) begünstigen [22–24]. Insgesamt führen diese Vorgänge zur Koordination und weiteren Amplifizierung der lokalen

Inflammation. Die Aktivierung der gewebsständigen Immunzellen und Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren leitet eine Expression von Adhäsionsmolekülen (Selektine) in benachbarten Endothelzellen ein und initiiert die Sezernierung von Zytokinen (IL-1 $\beta$  und IL-18), die die Migration von Neutrophilen Granulozyten zur betroffenen Region begünstigen [25–27]. Neutrophile Granulozyten im Blutstrom ligieren mittels membranständigen Integrinen an die Lektine der Endothelzellen und transmigrieren (Diapedese) durch das Gefäßendothel ins betroffene Gewebe [28]. Die Infiltration Neutrophiler Granulozyten ist eines der Hauptcharakteristika der akuten Inflammation [29]. Stimuliert durch einen direkten Kontakt mit den PAMPs oder DAMPs und durch die sezernierten Zytokine der gewebsständigen Immunzellen produzieren die Neutrophilen Granulozyten toxische Substanzen, welche die pathogenen Erreger eliminieren und weitere proinflammatorische Prozesse hervorrufen. Zu diesen toxischen Substanzen zählen ROS, reaktive Stickstoffspezies, Proteinase 3, Cathepsin G und Elastase [30]. Da die unspezifische Immunreaktion der Neutrophilen Granulozyten nicht zwischen pathogen Erregern und gewebsständigen Zellen unterscheidet, entstehen innerhalb des betroffenen Gewebes Kollateralschäden. Eine erfolgreiche Inflammation sorgt für die komplette Elimination des Induktors, gefolgt von der Auflösung (Resolution) der Inflammation und einer anschließenden Reparationsphase, die hauptsächlich durch gewebsständige Makrophagen koordiniert wird [6]. Innerhalb dieser Prozesse wechseln Makrophagen von der Produktion proinflammatorischer, zur Produktion antiinflammatorischen Mediatoren. Bei antiinflammatorischen Mediatoren handelt es sich um Lipoxine, Resolvine, IL-10 und *transforming growth factor* (TGF)  $\beta$  [6,31,32]. Diese Mediatoren beenden die Rekrutierung Neutrophiler Granulozyten und delegieren Monozyten zum betroffenen Gewebe. Angekommen im Gewebe differenzieren Monozyten zu M2 Makrophagen, sorgen für den Abbau geschädigter Zellen und für die Modellierung des geschädigten Gewebes [33,34]. Handelt es sich jedoch um eine ineffektive Immunantwort und kann der pathogene Erreger persistieren, werden weitere proinflammatorische Prozesse initiiert. Die lokalen Neutrophilen Granulozyten werden durch proinflammatorische M1 Makrophagen und T Zellen (Aktivierung des adaptiven Immunsystems) ersetzt. Diese Prozesse verursachen einen proinflammatorischen sich-selbst verstärkenden Regelkreis, der sich über die Grenzen des lokalen Gewebes auf den systemischen Blutstrom ausgebreitet [35,36]. Gelangen proinflammatorische Zytokine in den Blutstrom

und erreichen die Leber, wird ein Prozess in Gang gesetzt, der als Akutphasereaktion (*acute-phase-response*) bezeichnet wird. Die Leber beginnt mit der Produktion inflammations-begrenzender Proteine wie C-reaktives Protein (CRP), Serumamyloid A, Haptoglobin, Fibrinogen,  $\alpha$ -Globulin sowie Komplementfaktor 3 [37,38]. Die Prozesse werden von einer systemischen Temperaturerhöhung (Fieber, ausgelöst durch Interleukin-1-abhängige Prostaglandinproduktion im Temperaturregulationszentrum des ZNS) begleitet. Führt auch diese weitaus spezifischere Immunreaktion nicht zur Eliminierung des Erregers, entsteht eine chronische Inflammation. Neben dem Persistieren von pathogenen Erregern (infektiöse Inflammationen) können auch autoimmun und autoinflammatorische Erkrankungen sowie Krebserkrankungen zur Schädigung des Gewebes führen. Zusammenfassend ist das Ziel einer kontrollierten Inflammation eine Wiederherstellung der Homöostase nach Eliminierung eines Erregers. Falls jedoch eine Dysregulation der an der Inflammation beteiligten Mechanismen entsteht, kann eine Inflammation einen chronischen Verlauf einnehmen und Erkrankungen wie chronisch-entzündliche Darmerkrankungen und Krebs verursachen. In welchem Zusammenhang chronische Erkrankungen mit den Begriffen der Autoimmunität sowie der Autoinflammation stehen und was diese zwei Begriffe voneinander unterscheidet, soll im nächsten Abschnitt erläutert werden.

## 2.2 Autoinflammation versus Autoimmunität

Sowohl die Autoinflammation, als auch die Autoimmunität sind persistierende, meist schubweise verlaufende, chronisch-entzündliche Erkrankungen, welche auf einer Dysregulation des Immunsystems beruhen [39]. Störungen in diesen Mechanismen führen zu Dysfunktionen, die eine ineffektive und überschießende Immunantwort begünstigen [40,41]. Während eine Autoinflammation mit einer gestörten Immunantwort des angeborenen Immunsystems assoziiert ist, handelt es sich bei einer Autoimmunität um eine Fehlfunktion des adaptiven Immunsystems. Die systemischen und im klinischen Bild vermittelten intermittierenden Entzündungsprozesse der Autoinflammation beruhen auf einer Fehlfunktion des Inflammasoms und der krankhaften Produktion von Zytokinen der IL-1 Familie [42,43]. PAMPs und DAMPs aktivieren die intrazellulären Nukleotid-bindenden Oligomerisationsdomäne-(NOD)-like-Rezeptoren (Klasse von intrazellulären PRRs), welche eine entzündliche Kaskade

auslösen. Dies bewirkt eine Aktivierung des Inflammasoms, die Spaltung der Procaspase 1, sowie die Freisetzung von Zytokinen der IL-1 Familie. In der Akutphasereaktion führt das im Entzündungsgebiet aus lokalen Gewebe- oder Endothelzellen ins System freigesetzte IL-6 nicht nur zur Freisetzung verschiedener entzündungsregulierender Leberfaktoren, sondern auch zur Induktion von chronisch Entzündung assoziierten T Helferzellen (TH) 17 und begleitend, zur Unterdrückung der Differenzierungsprozesse regulatorischer T Zellen (Treg) [44–46]. Kennzeichen einer Autoinflammation sind periodische Fieberepisoden und ein Anstieg systemischen CRPs wie sie z.B. bei Morbus Still wiederzufinden sind [42,43]. Zwischen den Intervallen mit aktiven entzündlichen Schüben, zeigen Patienten mit einer Autoinflammation meist deutlich weniger starke Symptome (Remission). Bei einer Autoimmunität handelt es sich dagegen um eine B und T Zell-vermittelte, gegen das „Selbst“ gerichtete Entzündungsreaktion und somit um eine Dysregulation des adaptiven Immunsystems [42]. Die Autoimmunität basiert auf dem Verlust der Immuntoleranz, einer durch Autoantigene ausgelösten Reaktion der *cluster of differentiation* (CD) 4 und CD8 Lymphozyten und der Bildung von Autoantikörpern durch reife B Lymphozyten, den Plasmazellen. Beispiele sind Rheumatoide Arthritis und Systemischer Lupus Erythematoses [41,47]. Das adaptive Immunsystem des Organismus reagiert aufgrund der entzündlich abgesenkten Aktivierungsschwelle nicht nur mehr auf fremde Strukturen (z.B. Lipopolysaccharide von Mikroorganismen), sondern auf körpereigene extra- und intrazelluläre Strukturen (z.B. extrazelluläre Kollagen-3, lysosomale Proteine oder nukleäre, basische Desoxyribonukleinsäure/Histonkomplexe). In der chronischen Entzündung werden aufgrund von apoptotischen und nekrotischen Prozessen Gewebe- und Zellbestandteile freigesetzt, welche von DCs erkannt, phagozytiert und in sekundären lymphatischen Organen den T Zellen präsentiert werden. Es kommt zur Produktion von Typ-1 Interferonen (IFN $\alpha$  und IFN $\beta$ ), IL-12 oder IL-23, die die Reifung von DCs, die Antigenpräsentation, sowie die weitere proinflammatorische Differenzierung T und B Zellen zur Folge hat. Die aktivierten T Lymphozyten, z.B. mit einem typischen TH1, TH2 oder TH17 Profil, setzen prototypische Lymphokine frei, die auch die Ausrichtung eines spezifischen, gegen Autoantigen gerichteten Immunglobulinprofils der Plasmazellen induzieren und somit zum krankhaften Selbsterhalt der Entzündung beitragen [42,48]. Bei vielen chronisch-entzündliche Erkrankungen kann bisher noch keine exakte Kategorisierung in

Autoinflammation oder Autoimmunität vorgenommen werden. Ein bekanntes Beispiel sind chronisch-entzündliche Darmerkrankungen mit den beiden Hauptvertretern Colitis ulcerosa und Morbus Crohn. In beiden Erkrankungen sind sowohl Charakteristika einer Autoimmunität, als auch einer Autoinflammation vorzufinden [49,50]. Anhand einer weiteren Klassifizierung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen und der damit einhergehenden Charakterisierung von Subtypen kann eine exakte Einteilung in Autoinflammation und Autoimmunität zum Therapieerfolg mit patientenspezifischer Medikation beitragen. Essenziell hierfür sind Biomarker und Charakteristika, durch die eine klare Differenzierung zwischen diesen Subtypen vorgenommen werden kann.

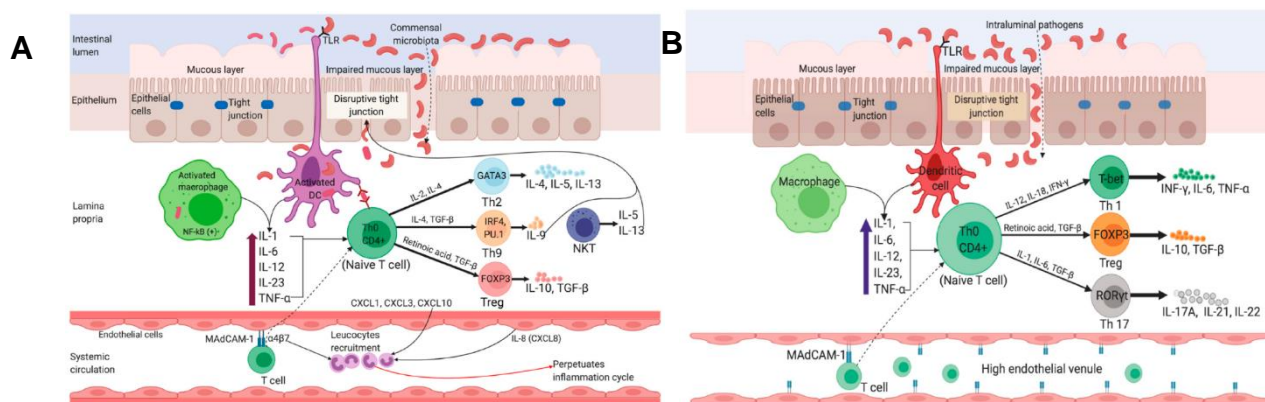
### 2.3 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Zu den schubweise-verlaufenden, chronisch-entzündlichen Erkrankungen des Darms gehören die zwei Hauptvertreter Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Weder für Morbus Crohn noch für Colitis ulcerosa existieren Behandlungsprotokolle, welche zur vollständigen Heilung der Erkrankungen beitragen. Das Therapieziel hierbei wird als „*mucosal healing*“ bezeichnet. Lediglich eine Verminderung der Symptome und somit eine Verbesserung der Lebensqualität kann mit medikamentösen und operativen Heilverfahren erreicht werden. Bei einem Dickdarmbefall ist bei beiden Erkrankungen eine erhöhte Krebswahrscheinlichkeit nachgewiesen, ein auf den Dünndarm begrenzter Morbus Crohn führt nicht eindeutig dazu [51]. Umso wichtiger ist es, die genauen Ursachen sowie die Pathophysiologie näher zu verstehen. Zudem ist klar zu erkennen, dass nur möglichst individualisierte, patientenspezifische Therapieansätze zum Erfolg führen. Bedeutend hierfür ist es, eine genaue Differenzialdiagnostik zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa gewährleisten zu können, sodass Patienten mit chronischen Darmentzündungen dem exakten Krankheitstyp zuzuordnen sind und gezielt therapiert werden können. Charakteristisch für Morbus Crohn ist eine diskontinuierliche und segmentale Inflammation, welche alle Ebenen der Gewebeschichten (transmural) befällt. Diverse Bereiche des gesamten Gastrointestinalen (GI)-Traktes können gleichzeitig betroffen sein, welche von gesunden nicht-entzündeten Bereichen flankiert sind. Statistisch gesehen sind die meisten Inflammationen im terminalen Ileum und im Kolon zu beobachten, trotzdem kann die Inflammation auch weitere extraintestinale Bereiche des Organismus befallen

[<sup>52,53</sup>]. Die Inzidenz, also die jährliche Anzahl an Neuerkrankungen, liegt bei 7 - 8 Patienten pro 100.000 Personen in den westlichen Industrienationen. Die Prävalenz, also der Bestand an Erkrankungen, liegt bei 150 Patienten auf 100.000 Personen. Frauen und Männer sind gleich häufig betroffen. Meist manifestiert sich Morbus Crohn im Alter von 15-35 Jahren oder im Alter ab 60 Jahren [<sup>54</sup>]. Die Inflammation bei Colitis ulcerosa ist dagegen auf das Kolon begrenzt. Nur in äußerst seltenen und schweren Fällen ist auch das Ileum betroffen. Zudem befällt die Inflammation lediglich die Darmschleimhaut (Mukosa und Submukosa) [<sup>52,53</sup>]. Die Inzidenz in den westlichen Industrienationen liegt bei 3 - 4 Neuerkrankungen auf 100.000 Personen. Die Prävalenz bei 160 – 250 Patienten auf 100.000 Personen. Es sind keine geschlechterspezifischen Unterschiede festzustellen. Meist tritt die Erkrankung im Alter von 20 - 40 Jahren auf [<sup>55</sup>]. Sowohl bei Morbus Crohn als auch bei Colitis ulcerosa sind die Ursachen der chronischen Inflammation nicht eindeutig geklärt. Insgesamt handelt es sich bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen um multifaktorielle Erkrankungen, die auf genetische Prädispositionen, krankhaft überschießenden Immunreaktionen, einer Veränderung des Mikrobioms oder auch auf Umwelteinflüsse zurückzuführen sind [<sup>56</sup>]. Beide Erkrankungen zeigen sowohl Anzeichen einer Autoinflammation, als auch Autoimmunität, sodass eine exakte Zuordnung nicht möglich ist. Der Lebensstandard von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ist in Bezug auf das große Spektrum an Symptomen deutlich gesenkt. Hierzu zählen Bauchschmerzen, häufiger Stuhlgang mit teilweise blutigen Durchfällen, Fieber, Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit, Übelkeit, Erbrechen, Fisteln und Abszesse, sowie Begleiterscheinungen wie Angstzustände und Depressionen [<sup>51</sup>]. Nicht therapiert verlaufen chronisch-entzündliche Darmerkrankungen in Schüben, welche von starken Exazerbationen der Inflammationen begleitet sind. Sie können mehrere Wochen anhalten und sich mit Phasen der Remission, in welchen oberflächlich keine aktive Inflammation nachzuweisen ist, abwechseln. Anhand der Pathophysiologie von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sind molekulare Muster beschrieben, die eine grobe, jedoch nicht exakte Charakterisierung beider Erkrankungen zulassen. Aktuell sind 163 veränderte Genregionen bekannt, welche mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert sind. Hiervon sind 110 Genregionen in beiden Erkrankungen nachzuweisen, 30 spezifisch für Morbus Crohn und 23 spezifisch für Colitis ulcerosa. Um nur einige wenige Beispiele zu nennen,

konnten Veränderungen in den Immunsystem assoziierten Genen *NOD2*, *IL23R* und *IL10R* identifiziert werden [57–60]. Zudem sind charakteristische Dysfunktionen in den Immunreaktionen von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa Patienten bekannt. Während Morbus Crohn als tendenziell TH1 assoziierte Immunerkrankung beschrieben wird, wird Colitis ulcerosa als eine eher TH2 assoziierte Immunerkrankung angesehen [61,62]. Dieses Dogma gilt es jedoch in Zukunft zu überdenken, da sowohl bei Morbus Crohn, als auch in Colitis ulcerosa Kennzeichen von beiden Immunreaktionen wiederzufinden sind [63,64]. Zudem zeigen aktuelle Studien, dass die TH17 Immunantwort und das Verhältnis von proinflammatorischen TH17 zu antiinflammatorischen Treg Zellen eine bedeutende Rolle spielt [65]. Zusammenfassend ist die Pathophysiologie bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen in Abbildung 1 dargestellt und wie folgt zu beschreiben: Eine Beeinträchtigung der *Tight-Junctions* (Dysfunktion der intestinalen Epithelzellbarriere) erhöht die Permeabilität des Darms und führt zum erhöhten Eintritt luminaler, bakterieller Antigene. Antigenpräsentierende Zellen (APCs) wie Makrophagen und DCs werden beim Erkennen pathogener Bakterien (*non-commensal microbiome*) durch *Toll-like* Rezeptoren (TLR, Klasse von PRRs), vor allem TLR2, TLR4 und TLR9, aktiviert. APCs initiieren zunächst die Aktivierung und dann abhängig vom „dritten Signal“ die Differenzierung von naiven CD4+ in T-Helferlymphozyten mit unterschiedlichen Effektorlymphokinprofilen. Bei Morbus Crohn spielt, zumindest in gut etablierten Mausmodellen wie der Trinitrobenzolsulfonsäure-Kolitis, der Master-Transkriptionsfaktor T-bet eine tragende Rolle, welcher die Differenzierung in TH1 Zellen mit dem charakteristischen Lymphokin IFN $\gamma$  begünstigt. Bei Colitis ulcerosa dagegen vermittelt GATA3, ein weiterer Transkriptionsfaktor, die Differenzierung in TH2 Zellen. TH2 Zellen sind charakteristisch für die Sezernierung der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13. Im weiteren Verlauf initiieren Zytokine und Chemokine die Rekrutierung weiterer Leukozyten, sodass ein sich-selbst verstärkender proinflammatorischer Kreislauf entsteht [51,66]. Besonders schwierig wird es für Gastroenterologen, wenn keine exakte Diagnose getroffen werden kann, also wenn ein Patient mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen sowohl Anzeichen von Morbus Crohn als auch einer Colitis ulcerosa zeigt. Dieser besondere Fall wird als Colitis indeterminata bezeichnet und liegt bei ca. 11 % neu diagnostizierter Patienten vor [67,68]. Umso wichtiger ist es neue Methoden und Biomarker zu identifizieren, die

Subtypen von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen anzeigen und ermöglichen ein gezieltes Therapieprotokoll anzuwenden.



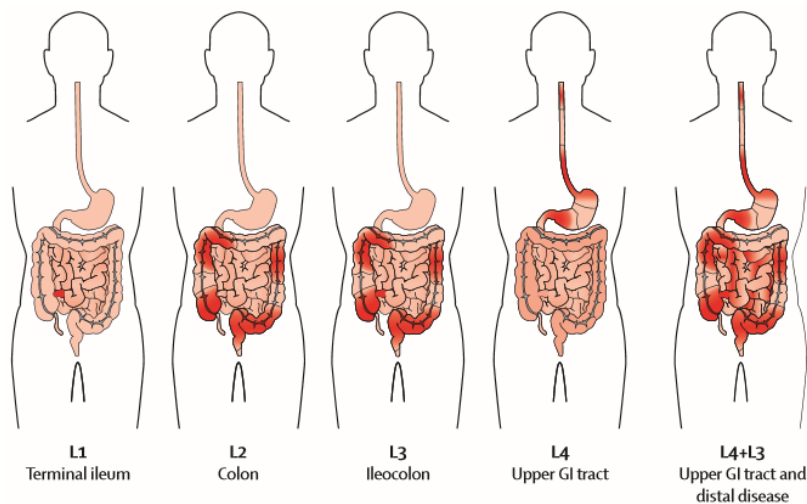
**Abbildung 1: Pathophysiologie bei (A) Colitis ulcerosa und (B) Morbus Crohn.** Auslösendes Signal ist eine Schädigung der Membranintegrität des intestinalen Epitheliums. Der Eintritt von pathogenen Erregern aktiviert APCs, die eine Differenzierung von TH0 Zellen in TH1, TH2, TH9, TH17 oder Treg Zellen begünstigen. Entscheidend sind die T Zell subtypspezifischen Transkriptionsfaktoren GATA3, IRF4, PU.1, FOXP3, T-bet und RORγt. Die Aktivierung von APCs sowie die Differenzierung von TH Zellen mit Produktion von krankheitsspezifischen Zytokinen und Chemokinen induziert eine weitere Rekrutierung von Immunzellen aus dem benachbarten Endothel. APC = Antigenpräsentierende Zelle, DC = Dendritische Zelle, FOXP3 = *Forkhead Box Protein 3*, GATA = *GATA Binding Protein*, IFN $\gamma$  = Interferon gamma, IL = Interleukin, IRF4 = *Interferon Regulatory Factor 4*, MAdCAM-1 = *Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule 1*, NKT = Natürliche Killer T Zelle, PU.1 = *Purine-Rich PU-Box Bindung Protein 1*, RORγt = *Retonoic Acid Receptor-Related Orphan Nuclear Receptor gamma*, TGF- $\beta$  = *Transforming Growth Factor beta*, Th = T Helferzelle, TNF- $\alpha$  = Tumornekrosefaktor alpha, TLR = Toll-like Rezeptor (nach Yeshi et al. [51])

### 2.3.1 Subtypen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen

Die Montreal-Klassifizierung betrachtet Morbus Crohn und Colitis ulcerosa getrennt voneinander, sodass eine erste Diagnose des Krankheitstyps schon vor der Klassifizierung in Subtypen durchgeführt werden muss. Ein Kriterium nach dem befundet wird, ist der betroffene Abschnitt des Darms und die Ausdehnung der Inflammation [69,70]. Bei Colitis ulcerosa werden drei Subtypen unterschieden. E1 bezeichnet eine Proktitis, E2 eine Linksseitenkolitis und E3 eine Pankolitis. Bei dem E1 Subtypen sind lediglich das Rektum und das Sigmoid von einer Inflammation betroffen. Zu beobachten ist dies bei 40 – 50% aller Colitis ulcerosa Patienten. Die



Inflammation bei einem E2 Subtyp breitet sich dagegen weiter auf Regionen bis zum Kolon transversum aus. Dies trifft auf etwa 30 – 40 % aller Colitis ulcerosa Patienten zu und wird als Linksseitenkolitis bezeichnet. Die Pankolitis beschreibt die weitaus stärkste, aber auch seltenste Form (ca. 20 % aller Colitis ulcerosa Patienten), da die Inflammation das gesamte Kolon betrifft und sogar das angrenzende Ileum befallen kann. Ist bei einem Colitis ulcerosa E3 Subtyp das Ileum betroffen, wird von einer *Backwash-Ileitis* gesprochen [71]. Bei Morbus Crohn sind fünf Subtypen beschrieben. Bei einem L1 Subtyp ist lediglich das Ileum betroffen. Der L2 Subtyp beschreibt Morbus Crohn Patienten, bei welchen lediglich das Kolon betroffen ist. Ist dagegen sowohl das Ileum als auch das Kolon betroffen, handelt es sich um den L3 Subtyp. Extraintestinale sowie Inflammationen des oberen GI-Traktes werden mit dem L4 Subtyp beschrieben. L4+ bezeichnet die weitaus stärkste Form von Morbus Crohn. Hierbei ist die Inflammation nicht nur auf eine intestinale Region begrenzt, sondern befällt diverse Regionen des oberen und unteren GI-Traktes, was auch extraintestinale Manifestationen beinhaltet [69,70]. Besonders bei Morbus Crohn sind anhand der lokalisationsabhängigen Klassifizierung in Subtypen auch deutlich unterschiedliche klinische Bilder zu beobachten. In der Praxis unterscheidet sich das therapeutische Ansprechen von Patienten des L1 Subtypen (Ileum-assoziiierter Morbus Crohn) häufig von dem des L2 Subtypen (Kolon-assoziiierter Morbus Crohn). Ein Beispiel ist das Ansprechen auf den monoklonalen Antikörper gegen TNF $\alpha$ , Infliximab. Patienten des L2 Subtypen sprechen besser auf eine Therapie mit Infliximab an, als Patienten des L1 Subtypen [72]. Darüber hinaus haben Studien, die auf einer Vielzahl serologischer [73], klinischer [74], mikrobieller [75] und genetischer [76–78] Marker basieren, genau diese Heterogenität in den Mustern der Beteiligung von Morbus Crohn Subtypen beschrieben. Obwohl die Lokalisation der Inflammation eindeutig mit unterschiedlichen klinischen Bildern bei Morbus Crohn Patienten in Verbindung gebracht wurde, sind die molekularen Mechanismen hinter diesen differentiellen Pathogenesen noch immer unklar [79]. In diesem Zusammenhang würde die Identifizierung eines Biomarkers, der in der Lage ist, die auf unterschiedlichen Phänotypen basierten Subtypen von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa klar zu differenzieren, einen entscheidenden Schritt auf dem Weg zu einer individualisierten Therapie darstellen.

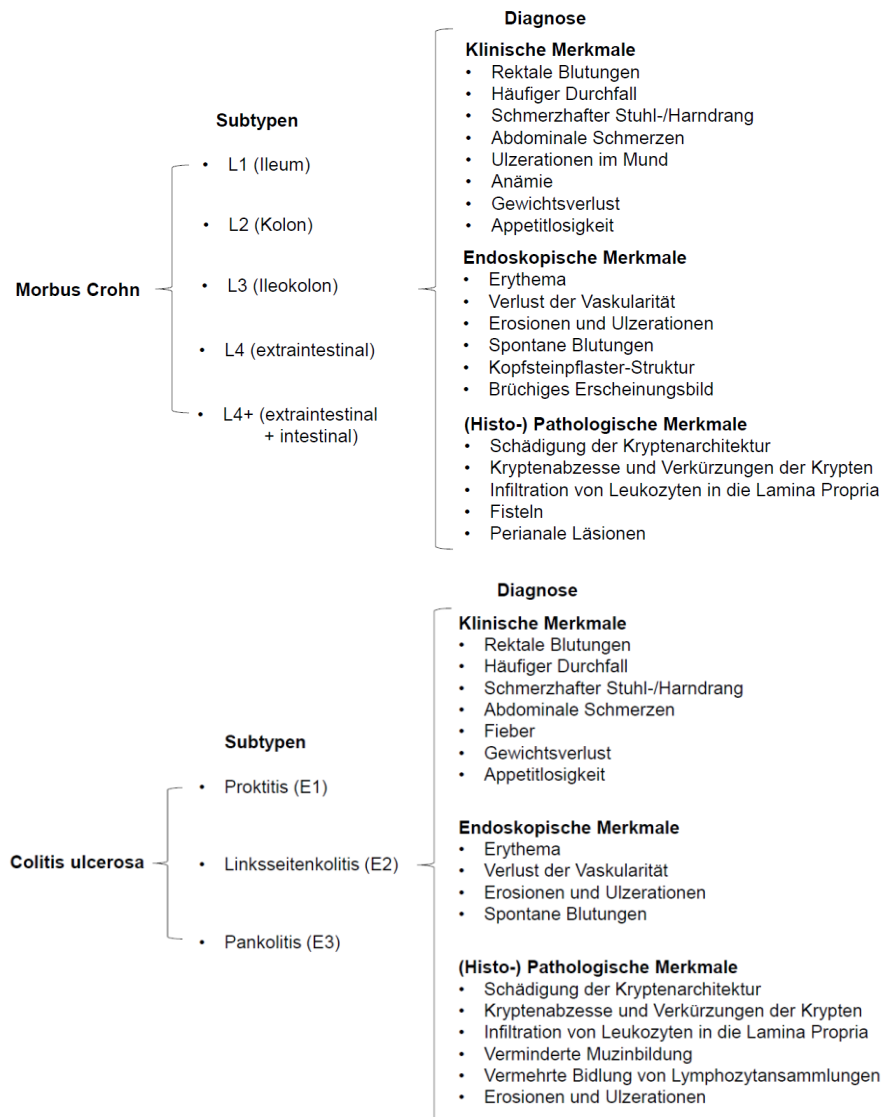


**Abbildung 2: Montreal Klassifizierung bei Morbus Crohn.** Dargestellt sind die Subtypen von Morbus Crohn klassifiziert nach betroffener Region der Inflammation. Die aktive Inflammation ist in tieferer Farbe gekennzeichnet. GI = Gastrointestinal (nach Baumgart und Sandborn et al. [70])

### 2.3.2 Problematik der Diagnostik bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Zur Diagnosestellung Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa ist der Gastroenterologe zumindest auf endoskopische, aber auch auf invasive, aufwändige und in jedem Fall kostenintensive Methoden angewiesen. Diese setzen sich zusammen aus dem klinischen Erscheinungsbild, dem endoskopischen Befund, wenigen allgemein anerkannten Laborparametern und histologischen Befunden. Hierbei muss der Gastroenterologe nicht nur zwischen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn unterscheiden können, sondern auch zwischen diesen klassischen chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und anderen Darmerkrankungen differenzieren. Die komplexe Diagnosestellung beinhaltet die klar definierte Abgrenzung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen zu (1) infektiösen Darmerkrankungen, (2) zu Nahrungsmittelallergien, zum irritablen Darmsyndrom, sowie (3) zur Zöliakie. Trotzdem ist die komplexeste Diagnosestellung die eindeutige Zuordnung und klare Abgrenzung zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa [80]. Abbildung 3 gibt einen Überblick über die klinischen, endoskopischen und (histo)-pathologischen Merkmale von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. Häufig kann keine eindeutige Zuordnung gewährleistet werden, da allgemeingültige Tests mit einer Sensitivität und Spezifität von näherungsweise 100% fehlen. Zwar sind die oben erwähnten Methoden

hilfreich und gewährleisten eine erfolgreiche Behandlung der Symptome, trotzdem treten immer wieder Fälle auf, bei welchen die Diagnose Colitis indeterminata gestellt wird [51]. Abhilfe schaffen sollten neue und spezifische Biomarker, welche dem Gastroenterologen eine Methodik zur Verfügung stellen, mit welcher eine patientenspezifischere Therapieform angewendet werden kann.



**Abbildung 3: Subtypen von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sowie die dazugehörigen Diagnosen dargestellt mit klinischen, endoskopischen und (histo-) pathologischen Merkmalen.**  
(nach Yeshi et al. [51])

### 2.3.3 Scoring-Systeme zur Befundung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Scoring-Systeme zur Befundung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen sollen eine Standardisierung der Diagnostik und des Therapieerfolges gewährleisten. Diese sind besonders für klinische Studien essenziell, da sie eine eindeutige Kategorisierung der Patienten zulassen. Leider fehlt in der Praxis häufig die Validierung und zudem sind viele der Scores Subtyp-unspezifisch (im Sinne der Montreal-Klassifizierung). Der folgende Abschnitt sowie Tabelle 1 soll einen Überblick über die gängigen und in der Klinik am häufigsten angewendeten Scoring-Systeme geben. Hierbei wird in klinische, endoskopische und histologische Scores gegliedert. Sie dienen dem Gastroenterologen anhand von numerischen Indizes eine Befundung in gesund, in Remission oder in aktiven Schub vorzunehmen. Abhängig vom jeweiligen Score kann diese Befundung noch spezifiziert werden und den Schweregrad der Erkrankung erfassen. Häufig gestaltet sich die routinemäßige Erstellung von Scores in der Praxis als schwierig umsetzbar, da dies mit komplizierten und aufwändigen Vorgehensweisen verbunden ist. Zudem gibt es Scoring-Systeme die sich optimal für klinische Studien eignen, jedoch wenig vorteilhaft für eine Anwendungshilfe zur Therapiefindung sowie Verlaufsdiagnose der Patienten beitragen und umgekehrt [81]. Bei Colitis ulcerosa sind die zwei am häufigsten in der Praxis verwendeten klinischen Scores der *Simple Colitis Clinical Activity Index* (SCCAI) [82,83] sowie der *Mayo Score* [84]. Vorteilhaft am *Mayo Score* ist, dass dieser bei der Erstellung auch endoskopische Parameter erfasst. Neben dem *Mayo Score* wird häufig auch der *Baron Score* [85] erstellt. Bei Morbus Crohn ist die Erstellung des *Harvey-Bradshaw Index* (HBI) sowie des *Crohn's Disease Activity Index* (CDAI) am geläufigsten [86,87]. Beide Einteilungen basieren auf rein klinischen Parametern. Bei der Erstellung von Morbus Cohn spezifischen endoskopischen Scores sind der *Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity* (CDEIS) [88] und der *Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease* (SES-CD) [89] am geläufigsten. Schwierig gestaltet es sich bei der optimalen Erstellung von histologischen Scores, da es lediglich für Colitis ulcerosa akzeptierte Scores gibt. Für Morbus Crohn gibt es keinen validierten Score. Um reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse gewährleisten zu können, wird ein Colitis ulcerosa Score für die Befundung von Morbus Crohn Gewebeproben verwendet. Hierzu erstellen Pathologen meist den Riley [90] oder den Geboes Score [91]. Die Parameter aus welchen sich die Scores

ergeben sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Zwar ist das Erstellen von krankheitsspezifischem Scores mit viel Aufwand verbunden, trotzdem sind die Scores essenziell, um zumindest näherungsweise das Ziel einer exakten Klassifizierung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen relevanten Subtypen zu erreichen.

**Tabelle 1: Überblick der klinischen, endoskopischen und histologischen Scores bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.**

	<b>Klinische Scores</b>	<b>Endoskopische Scores</b>	<b>Histologische Scores</b>
<b>Morbus Crohn</b> (Parameter)	<b>1. HBI</b> -Allgemeinbefinden -Schwere der Bauchschmerzen -Anzahl ungeformter Stuhlgänge pro Tag -abdominale Resistenz -Anzahl an neuen Komplikationen <b>2. CDAI</b> -Allgemeinbefinden in den letzten 7 Tagen -Schwere der Bauchschmerzen in den letzten 7 Tagen -Anzahl ungeformter Stuhlgänge in den letzten 7 Tagen -abdominale Resistenz -Anzahl an neuen Komplikationen -Symptomatische Durchfallbehandlung -Abweichung des Hämatokrit von 47% bei Männern und 42% bei Frauen -Abweichung vom Standardgewicht in %	<b>3. CDEIS</b> -Befundung betroffener und auffälliger Regionen -Tiefe Ulzeration -Oberflächliche Ulzeration -Ausdehnung Ulzeration -Ausdehnung Läsion -Vorhandensein Stenosen <b>4. SES-CD</b> -Befundung betroffener und auffälliger Regionen -Größe Ulzeration -Ausdehnung Ulzeration -Ausdehnung Läsion -Stenosen	Siehe Colitis Ulcerosa; für Morbus Crohn keine validierten Scores vorhanden
<b>Colitis ulcerosa</b> (Parameter)	<b>1. SCCAI</b> -Darmfrequenz pro Tag -Darmfrequenz pro Nacht -Dringlichkeit des Stuhlganges -Blut im Stuhl -Allgemeinbefinden -Extraintestinale Manifestationen <b>2. Mayo Score</b> -Stuhlfrequenz pro Tag -rektalen Blutabgang -endoskopische Befunde -globale Beurteilung des Arztes	<b>3. Mayo Score (Endoskopische Befunde)</b> -normaler Befund oder inaktive Erkrankung -Erythem mit leicht spröder Schleimhaut -deutliches Erythem mit Erosionen und Gefäßmuster verschwunden <b>4. Baron Score</b> -normale Mukosa -entzündliche Veränderung ohne Hämorrhagie	<b>5. Riley Score</b> -Akute Infiltration von inflammatorischen Zellen (PMN in der Lamina Propria) -Abszesse der Krypten -Muzin Depletion -Schädigung der epithelialen Oberflächenintegrität -chronische inflammatorische Zellinfiltration (runde Zellen in der Lamina Propria)

		-Blutungen bei leichter endoskopischer Manipulation -Spontanblutung	-Irregularitäten in der Kryptenarchitektur <b>6. Geboes Score</b> -Keine inflammatorische Aktivität -basale Plasmazellen -Eosinophile Granulozyten in der Lamina Propria -Neutrophile Granulozyten in der Lamina Propria -Neutrophile Granulozyten im Epithelium -Epitheliale Schädigungen (Krypten und Oberflächenepithel)
--	--	--	--

CDAI: *Crohn's Disease Activity Index*, CDEIS: *Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity*, HBI: *Harvey-Bradshaw Index*, SCCAI: *Simple Colitis Clinical Activity Index*, SES-CD: *Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease*, PMN = Polymorphkernige Zellen

## 2.4 Biomarker

### 2.4.1 Begriffserklärung Biomarker

Der Schlüssel zur Anwendung und Optimierung personalisierter Medizin liegt in der Erforschung von neuen Biomarkern. Die moderne Medizin beschäftigt sich mit Methoden, die sich von allgemeingültigen Standardtherapien entfernen und auf zielgerichtete Therapien hinbewegen. Mittelweile breitet sich die Suche nach neuen Biomarkern auf alle Forschungsbereiche aus. Diese betreffen insbesondere die Onkologie und die Immunologie. Das Ziel ist es Erkrankungen sowie mögliche Subtypen zu erkennen, darauf aufbauend eine Therapieform zu wählen, von welcher der Patient am meisten profitiert und gleichzeitig potenzielle Nebenwirkungen auf ein Minimum begrenzt. Im Weiteren geben Biomarker Hinweise, ob eine gezielte personalisierte Therapieform wirkt sowie Informationen über den Verlauf einer Erkrankung. Medizinische Biomarker dienen als Indikator für biologische Merkmale. Sie beinhalten sowohl natürliche physiologische als auch krankhafte pathophysiologische Prozesse [92–94]. Vereinfacht darzustellen ist dies anhand von bekannten Beispielen. Eine erhöhte Temperatur ist ein Biomarker zur Diagnose von Fieber, Zucker im Urin wiederum ein Biomarker zur Diagnose von Diabetes mellitus und

erhöhte Cholesterinwerte, ein Biomarker zur Diagnose von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Biomarker sind nützlich für das Aufdecken von bisher verborgenen Dysfunktionen des Organismus. Unterteilt werden Biomarker in bildgebend und molekular. Nachzuweisen sind molekulare Biomarker in biologischen Materialien wie Blut-, Urin-, Gewebe- und Stuhlproben. Die Art eines molekularen Biomarkers ist nicht genau spezifiziert. Gene, DNA Transkripte, Lipide, Peptide, Proteine und Metabolite können als Biomarker fungieren [95]. Zusätzlich werden Klassifizierungen in drei Subkategorien vorgenommen. Diese inkludieren (1) diagnostische, (2) prognostische und (3) prädikative Biomarker. (1) Diagnostische Biomarker sind krankheitsbezogen und geben Hinweise, ob sich die Verdachtsdiagnose einer Erkrankung erhärten lässt oder nicht. Zudem kann anhand eines diagnostischen Biomarkers eine Einteilung in Subtypen vorgenommen werden. (2) Prognostische Biomarker sind behandlungsbezogen und geben an, wie sich eine Krankheit beispielsweise innerhalb einer gezielten Therapieform entwickelt. (3) Prädikative Biomarker sind ebenfalls behandlungsbezogen und schätzen ab, wie wahrscheinlich die Wirkung einer Behandlung ist [96]. Bekannte molekulare und spezifische Biomarker sind der Anstieg von CRP im Blutplasma zur Indikation einer Inflammation [97], das Vorhandensein einer KRAS Genmutation im Kolongewebe zur Diagnose eines Kolorektalen Adenokarzinoms [98] sowie das prostataspezifische Antigen im Blutplasma zur Identifizierung von Patienten eines Prostatakarzinoms [99]. Besonders bei Erkrankungen wie chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ist die Suche nach molekularen Biomarkern essenziell, da Klassifizierungen in Subtypen eine patientenspezifische Therapieform zulassen und Aufschluss über bisher unbekannte Pathophysiologien geben. Im nächsten Abschnitt soll deshalb ein Überblick über spezifische Biomarker von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen gegeben werden.

#### **2.4.2 Molekulare Biomarker zur Differenzierung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und Nutzen in der personalisierten Medizin**

Aktuell existiert kein diagnostischer Test, bei welchem sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität eindeutige Ergebnisse liefert und eine exakte Differenzierung zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa gewährleistet. Gastroenterologen nutzen

Kombinationen aus diversen Methoden, um näherungsweise, jedoch nicht mit einer 100%igen Genauigkeit, eine Diagnose zu stellen, auf der basierend eine geeignete Therapie angewendet werden kann. Diese Methoden beinhalten klinische Prüfungen, laborbasierte Analysen sowie Endoskopien und Darmbiopsien mit anschließender histologischer Befundung. Nachteilig ist, dass das bisherige Vorgehen der Befundung mit zeitaufwändigen und invasiven Eingriffen verbunden ist. Der ideale Biomarker sollte folgende Eigenschaften aufweisen: Er sollte krankheitsspezifisch sein, in der Lage sein Risikopatienten zu identifizieren, die Krankheitsaktivität zu erkennen, die Auswirkungen der Therapie zu überwachen und auch prognostisch wertvoll sein, um einen Rückfall oder ein Wiederauftreten der Krankheit frühzeitig zu erkennen [100]. Zudem bleibt die Frage ungeklärt, ob diese Biomarker für Behandlungsentscheidungen und für die Stratifizierung der Therapie hilfreich sind. Die erwähnten Kriterien in einem einzigen Biomarker zu vereinigen, erscheint als unmögliches Unterfangen. Aus diesem Grund ist es wichtig bekannte Biomarker zu kombinieren. Die wohl bekanntesten Biomarker zur Differenzierung von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sind serologische Untersuchungen des *perinuclear antineutrophil cytoplasmatic antibodies* (pANCA) und des *anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies* (ASCA) [101,102,103]. Erhöhte Niveaus von pANCA sind häufig bei Colitis ulcerosa Patienten zu beobachten [101]. ASCAs zeigten dagegen in Morbus Crohn Patienten erhöhte Titer. Die Spezifität liegt hierbei bei 95%. Problematisch ist die Sensitivität, welche bei 50% liegt [101]. Eine Anwendung des pANCA/ASCA-Status zeigte in Studien vielversprechende Ergebnisse, jedoch blieb auch in diesen Arbeiten eine 100%ige Genauigkeit aus [104]. Zusammenfassend eignet sich der pANCA/ASCA-Status also lediglich als weiteres optionales Hilfsmittel zur Diagnosestellung. Um die Krankheitsaktivität, also die Schwere der Inflammation, diagnostizieren zu können, existieren diverse Biomarker. Hierzu zählen die fäkalen Analysen von S100A12 [105], Lipocalin 2 [106] und Lactoferrin [107]. Die zwei bekanntesten Biomarker sind fäkales Calprotectin (S100A8/S100A9) [108] und serologisches CRP [109]. Unter physiologischen Bedingungen liegt die CRP Konzentration im Blut bei weniger als 1 mg/L. Bei einer akuten Inflammation können diese Konzentrationen bis auf 500 mg/L ansteigen [110]. Die Halbwertszeit von CRP liegt bei 19 Std., sodass sich CRP lediglich als diagnostische Methode zur Identifikation einer akuten Inflammation eignet und somit nützlich ist, um Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen im



Schub und Remission voneinander zu trennen [108]. Problematisch jedoch ist, dass CRP als genereller Inflammationsmarker und Indikator für Gewebsschädigungen betrachtet werden muss, da in einem großen Spektrum an Erkrankungen (z.B. Atemwegserkrankungen, Rheuma, aber auch teilweise Tumorerkrankungen) erhöhte Blutkonzentrationen von CRP zu beobachten sind [108]. Eine Darm-lokalisierte Inflammation kann nicht eindeutig diagnostiziert werden. Letztendlich ist CRP lediglich als weiteres Hilfsmittel zur Diagnosestellung und Therapiewahl geeignet. Als weitaus spezifischer und mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert ist der fäkale Biomarker Calprotectin beschrieben. Calprotectin wird von aktivierten Neutrophilen Granulozyten produziert. Die Analyse von Calprotectin in Stuhlproben ist als proportionales Maß zur Infiltration von Neutrophilen Granulozyten in den GI-Trakt anerkannt [108]. In Studien konnte gezeigt werden, dass sich fäkales Calprotectin zur Differenzierung von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen in Remission und im Schub eignet [111,112], den mukösen Heilungsprozess widerspiegelt [113], Rückfallwahrscheinlichkeiten anzeigt [114] sowie das therapeutische Ansprechen projiziert [115]. Trotz der Vorteile von fäkalem Calprotectin, ist auch dieser Biomarker nicht für die exakte Differenzierung zwischen Subtypen von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen geeignet. Hohe Erwartung werden in umfassendere neuere Studien zu Biomarker-Signaturen gesetzt. Die Erstellung einer Biomarker-Signatur hat als Ziel, anhand von neuen Methoden wie etwa Proteomik und Metabolomik, kombinatorisch Biomarker aus diversen Stoffwechselwegen miteinander zu verknüpfen. Besonders interessant auf der Suche nach einer Biomarker-Signatur bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ist der Immunmetabolismus.

## **2.5 Immunmetabolismus: Von der Immunhomöostase zur Immunreprogrammierung**

Als Immunmetabolismus wird das interdisziplinäre Forschungsgebiet der Interaktion von immunologischen und metabolischen Prozessen beschrieben [116]. Zwischen der biochemischen Abfolge des Umsatzes eines Substrats über enzymatische Reaktionen in ein finales Endprodukt entstehen Zwischenprodukte (Metabolite), welche nicht nur als Substrat für aufeinanderfolgende enzymatische Reaktionen, sondern mittlerweile als intra- und transzelluläre Effektormoleküle betrachtet werden sollten [117]. Das Zusammenspiel von Metaboliten mit möglichen Effektorfunktionen sowie der Einfluss

dieser Metabolite auf das Immunsystems und die damit assoziierten Erkrankungen sind in den letzten Jahren in den Fokus der Forschung gerückt. Auch vor mehr als 30 Jahren gab es Immunologen, die sich mit metabolischen Prozessen von Immunzellen auseinandersetzten, jedoch war das Ziel das Verständnis der zellspezifischen Energieproduktion von sich schnell teilenden Effektorzellen zu erweitern und nicht die potentiellen Effektorfunktionen von Metaboliten und die damit assoziierten Erkrankungen zu entschlüsseln [118–121]. Technologische Innovationen wie die Weiterentwicklung von sensitiven analytischen Methoden (u.a. LC-MS/MS) und Werkzeuge zur Messung der Durchsatzrate von Metaboliten (*Metabolic-Flux*) erlauben es nun höchst sensitive Studien im Forschungsbereich der „Metabolomik“ durchzuführen, welche Metabolitmuster spezifischen Zellen und Erkrankungen zuordnen können sowie den Einfluss von Metaboliten an zellspezifischen Differenzierungsprozessen untersuchen [116]. Der Immunmetabolismus gliedert sich in zwei Klassen. Der zelluläre Immunmetabolismus beschreibt phänotypische und funktionelle Veränderungen innerhalb metabolischer Stoffwechselwege von Immunzellklassen unter diversen pathologischen Konditionen [116,122]. Dagegen beschreibt der gewebspezifische Immunmetabolismus den Einfluss der Interaktion von Immunzellen mit gewebs- und organspezifischen Zellen auf systemische Veränderungen des Organismus [116,122]. Ursächlich für eine Veränderung des Immunmetabolismus und somit des Übergangs von homöostatischen zu pathologischen Konditionen, sind die molekulare Prozesse einer Inflammation. Der Verlust der Immunhomöostase (Soll-Zustand) ausgelöst durch eine Inflammation wird als Immunreprogrammierung (Ist-Zustand) bezeichnet [117]. In chronisch-entzündlichen Erkrankungen konnten signifikante Veränderungen von systemischen Metabolitkonzentration, sowie Veränderungen von zellulären Metabolitkonzentrationen beobachtet werden. Einige Beispiele hierfür sind Typ2 Diabetes mellitus [123–125], Hyperlipämie [126–128] sowie Krebserkrankungen [129–131]. Aktuell sind sechs Stoffwechselwege bekannt, die signifikante Veränderungen des Immunmetabolismus beschreiben. Diese Stoffwechselwege sind (1) die Glykolyse, (2) der Zitratzyklus, (3) der Pentosephosphatweg, (4) die Fettsäureoxidation sowie (5) die Fettsäuresynthese und (6) der Aminosäuremetabolismus [116]. Gibt es Gemeinsamkeiten und zentralen Regulatoren, welche in allen Stoffwechselwegen der Immunreprogrammierung involviert sind? Um dieses Konzept darzustellen sollte das

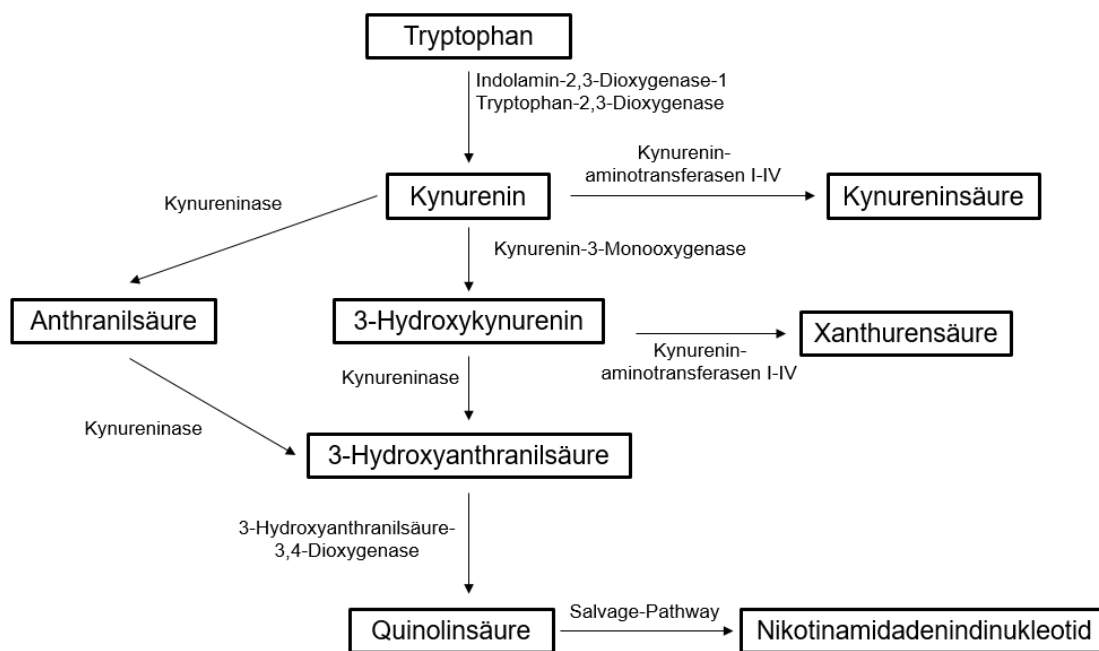
Immunsystem aus der Perspektive von proinflammatorischen Effektoren (u.a. CD8+ Effektor T-Zellen, M1 Makrophagen) und antiinflammatorischen Regulatoren (u.a. Tregs, M2 Makrophagen) betrachtet werden. (1) Die Glykolyse beschreibt den Umsatz von einem Molekül Glucose zu einem Molekül Pyruvat sowie die im Vergleich zu anderen Energie-liefernden intrazellulären Prozessen ineffektive Produktion von zwei Molekülen ATP. Im Weiteren entsteht durch die Reduktion von Nicotinamidadenindinukleotid (NAD<sup>+</sup>) das Molekül NADH, das für zahlreiche Enzyme als Kofaktor dient, sowie Intermediate (z.B. Ribose für die Produktion von Nukleotiden) für die Biosynthese weiterer Moleküle bildet. Hieraus ist zu erkennen, dass die Glykolyse eine essentielle und dominante Rolle im Metabolismus von hoch proliferativen Immunzellen einnimmt [118,119]. In Effektorzellen (Effektor CD8+ T Zellen, DCs, NK Zellen, B Zellen, TH1, TH2 und TH17 Zellen) konnte nachgewiesen werden, dass eine Aktivierung durch Stimulation der PRRs, Zytokin- und Antigenrezeptoren eine Erhöhung der Glykolyse hervorruft [132–136]. Im Gegensatz dazu nimmt die Glykolyse bei regulatorischen Zellen des Immunsystems eher eine untergeordnete Rolle ein [137–139]. In diesen Zellen ist der Mechanismus zur Gewinnung von ATP der (2) Zitratzyklus. Studien zeigten, dass in Gedächtnis (*memory*) CD8+ T Zellen [140] und M2 Makrophagen [137] der Zitratzyklus gegenüber der Glykolyse überwiegt. Anhand der dichotomen Verwertung von Glukose durch Immunzellen ist ein erstes grundlegendes Prinzip zu erkennen. Während Effektorzellen des Immunsystems die ineffektive Glykolyse als Hauptenergiequelle nutzen, tendieren Regulatoren zum effektiven Zitratzyklus. Innerhalb des (3) Pentosephosphatweges, welcher zur Produktion von Nucleotiden und zur Synthese von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) dient, konnte in aktivierten Neutrophilen Granulozyten eine Aktivitätssteigerung beobachtet werden [116]. Dies ist damit zu begründen, dass Neutrophile Granulozyten für die Produktion von ROS und den Prozess des *Respiratory Bursts*, hohe Konzentrationen von NADPH benötigen. Besonders interessant ist die dichotomische regulatorische Rolle des Fettsäurestoffwechsels innerhalb des Immunmetabolismus. (4) Die Fettsäureoxidation ist in regulatorischen und langlebigen Zellen des Immunsystems zu beobachten. Dies betrifft M2 Makrophagen [141,142], Tregs [135] und Gedächtnis (*memory*) T Zellen [143,144]. So konnte gezeigt werden, dass die Fettsäureoxidation das Verhältnis von pro- und antiinflammatorischen T Zellen reguliert. Eine Inhibition dieses Stoffwechselweges führt zur Ausbildung von Effektor

T Zellen, während eine Induktion eine Zunahme von Gedächtnis (*memory*) und Treg Zellen fördert [135]. Gegensätzlich dazu zeigen proinflammatorische Effektorzellen eine erhöhte (5) Fettsäuresynthese. Eine Erhöhung der Fettsäuresynthese konnte bei Aktivierung von DCs, sowie T und B Zellen beobachtet werden [145–149]. Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Fettsäureoxidation und Fettsäuresynthese gegensätzliche Rollen in der Regulation des Immunsystems einnehmen. Während Effektorzellen des Immunsystems die Fettsäuresynthese zur Membranbiosynthese sowie zum Zellwachstum nutzen und die effektive Produktion von ATP eher vernachlässigen, nutzen regulatorische Zellen des Immunsystems die Fettsäureoxidation um limitierende Nährstoffmoleküle effektiv zu verwerten. Ein weiterer Stoffwechselweg, welcher an der Regulation des Immunmetabolismus beteiligt ist, ist der Aminosäurestoffwechsel [116]. Bei 21 essenziellen Aminosäuren nimmt Tryptophan hierbei die interessanteste Rolle ein. Im nächsten Abschnitt soll deshalb näher auf den Tryptophanstoffwechsel eingegangen werden. Zusammenfassend zeigt der Immunmetabolismus und die pathophysiologische Veränderung von Metabolitströmen großes Potential zur Erforschung von Biomarkern und zur Entwicklung von neuen patientenspezifischen Therapieformen. Eine Steuerung der Immunantwort durch Modulation des Immunmetabolismus unter Beeinflussung von Proteinsyntheseraten, Lebensdauer der Zellen und Zytokinsekretion könnte neue Möglichkeiten eröffnen um chronisch-entzündliche Erkrankungen individuell zu diagnostizieren und zu therapieren.

## 2.6 Tryptophanstoffwechsel

Tryptophan wird im menschlichen Organismus über fünf verschiedene Abbauewege verstoffwechselt. Der bekannteste dieser Abbauewege ist die (1) Proteinbiosynthese. Zudem ist Tryptophan an der Produktion von biologisch aktiven Metaboliten durch drei weitere Stoffwechselwege beteiligt. Diese beinhalten (2) die Hydroxylierung zu Serotonin sowie Melatonin, (3) die Decarboxylierung zu Tryptamin und (4) die Transaminierung zu Indol-3-Pyruvat. Ca. 95% des aufgenommenen Tryptophans wird über den (5) Kynureninstoffwechsel abgebaut. Abbildung 4 zeigt den Abbau von Tryptophan über Kynurenin zu NAD<sup>+</sup>. Unter physiologischen Bedingungen degradiert das in der Leber lokalisierte Enzym Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO) Tryptophan zu Kynurenin. TDO verstoffwechselt mit einem Anteil von ca. 90% den Großteil an

Tryptophan. Die restlichen 5 - 10% werden über das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase 1 (IDO1) in der Peripherie abgebaut. Sowohl TDO, als auch IDO1 produzieren Kynurenin. Während TDO den physiologischen Abbau von Tryptophan gewährleistet, spielt IDO1 bei der inflammations-bedingten Regulation des Immunsystems eine tragende Rolle. Kynurenin, als erster Metabolit des Tryptophanstoffwechsels, nimmt hierbei eine Schlüsselfunktion ein, da von Kynurenin ausgehend drei weitere biologisch aktive Metabolite gebildet werden. Über die Kynureninaminotransferasen (vier Isoformen; I – IV) entsteht (1) Kynureninsäure. Über die Kynurenin-3-Monooxygenase der Metabolit (2) 3-Hydroxykynurenin, welcher über Kynureninaminotransferasen zu Xanthurensäure oder über die Kynureninase (KYNU) zu 3-Hydroxyanthranilsäure (3-HAA) verstoffwechselt wird. Die dritte Möglichkeit ist die Degradation über den Metaboliten (3) Anthranilsäure zu 3-HAA. 3-HAA wird anschließend über 3-Hydroxyanthranilsäure-3,4-Dioxygenase zu Quinolinsäure verstoffwechselt und innerhalb des *Salvage-Pathways* zur Synthese von NAD<sup>+</sup> verwertet.



**Abbildung 4: Schema des Tryptophanstoffwechsels zur Produktion von Nikotinamidadenindinukleotid über Kynurenin.**

Über welchen Weg Kynurenin weiter metabolisiert wird, hängt von diversen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen ab und ist bisher nicht eindeutig beschrieben. Eindeutig beschrieben ist jedoch, dass Ungleichgewichte im Muster von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen Einfluss auf die Produktion von Kynurenin und weiteren Tryptophanmetaboliten in extrahepatischen Geweben nehmen [150]. Die Hauptfunktion des Tryptophanstoffwechsels ist die Produktion von NAD<sup>+</sup> [151,152]. Dagegen ist nach heutigem Stand der Wissenschaft die Hauptauswirkung eines deregulierten Tryptophanstoffwechsels die Anreicherung von Kynurenin und damit verbunden eine immunsuppressive und tumorfördernde Wirkung [153,154]. Bei einer Inflammation wird die in APCs lokalisierte IDO1 Proteinexpression sowie Enzymaktivität gesteigert. Hauptinduktoren sind proinflammatorischen Zytokine wie IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  [155,156]. Dies führt zur vermehrten Produktion von Kynurenin, das überwiegend immunsuppressive Effekte hat. Hierbei ist beschrieben, dass Kynurenin an der Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T Zellen in regulatorische und TH17 Zellen beteiligt ist [157,158]. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass Kynurenin die Proliferation sowie Aktivität von T Effektorzellen inhibiert, indem die Immuncheckpoint assoziierten Proteinen *Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein-4* (CTLA-4) und *Programmed Cell Death Protein-1* (PD-1) verstärkt exprimiert werden. Als zentraler Interaktionspartner von Kynurenin ist der intrazelluläre Transkriptionsfaktor Arylhydrocarbonrezeptor (AhR) beschrieben. AhR transloziert nach Kontakt mit Kynurenin vom Zytoplasma in den Nukleus und löst dort diverse Genregulationen aus, welche mit einer immunsuppressiven und somit tumorigenen Funktion assoziiert sind [159–161]. Neben dem Einfluss von Kynurenin auf Immunzellen, sind tumorigene Wirkungen auf Epithelzellen beschrieben. Kynurenin aktiviert den WNT-Signalweg und die Produktion von  $\beta$ -Catenin. Eine erhöhte Produktion von  $\beta$ -Catenin konnte in Krebserkrankungen nachgewiesen werden und induziert eine Hyperproliferation [162,163]. In diesem Zusammenhang korreliert eine erhöhte IDO1 Expression mit einer schlechten Prognose bei Krebserkrankungen [164,165]. Basierend auf diesen Erkenntnissen entwickelten Pharmakonzerne spezifische Inhibitoren gegen IDO1 und TDO, welche aus bisher nicht geklärten Gründen gescheitert sind [166].

Während sowohl Tryptophan und Kynurenin als auch die entsprechenden Enzyme IDO1 und TDO eingehend untersucht wurden, sind die biologischen Funktionen von nachgeschalteten Enzymen und Metaboliten des Tryptophanstoffwechsels noch

unbekannt. *Harden* et al. zeigten eine Zunahme der Expression der KYNU bei der TH1/TH17-Lymphozyten-assoziierten Hauterkrankung Psoriasis sowie bei den allgemeinen klinischen Manifestationen chronisch-entzündlicher Erkrankungen. Die Autoren schlussfolgerten, dass KYNU als dichotomischer Modulator von Immunreaktionen wirken kann, indem es den Wechsel zwischen Immunsuppression und proinflammatorischen Prozessen reguliert. Während bei Krebserkrankungen IDO1 bevorzugt reguliert wird, wurde bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie Psoriasis und atopischer Dermatitis festgestellt, dass eine Erhöhung der KYNU im Vergleich zur IDO1 ausgeprägter ist [167]. Ob KYNU bei weiteren chronisch-entzündlichen Erkrankungen erhöht ist, und welche Funktion dieses Enzym bei der Entstehung und dem Verlauf chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen hat, ist noch unklar. Dies wirft die Frage auf, ob die inflammationsbedingten Pathologien durch eine Abnahme der lokalen Kynurenin Konzentration entstehen, oder ob sie durch einen Anstieg nachfolgender, potenziell proinflammatorischer, Tryptophanmetabolite verursacht werden. Wie zuvor beschrieben wandelt KYNU Kynurenin, Anthranilsäure und 3-Hydroxykynurenin in 3-HAA um. Studien haben gezeigt, dass 3-HAA eine direkte toxische Wirkung in Immunzellen auslöst, hauptsächlich durch die Produktion von ROS, was zu Störungen des mitochondrialen Membranpotentials führt [168–170]. Dies bewirkt funktionelle Störungen im Energiestoffwechsel von Immunzellen, die indirekt durch die Produktion von NAD<sup>+</sup> angezeigt werden [171]. Darüber hinaus zeigten *Hayashi* et al., dass 3-HAA die Phosphoinositid-abhängige Kinase-1 (PDK1) in T-Zellen hemmt [172]. PDK1 ist essenziell für die Aktivierung von T-Zellen. Ein PDK1-Knockout in murinen T-Zellen führte zur spontanen Entwicklung einer chronischen Entzündung im GI-Trakt. Die Autoren führten diesen Befund auf ein Versagen der Treg-Aktivierung zurück (im Gegensatz zu Gamma/Delta-T-Zellen, die nicht betroffen waren) und postulierten, dass die persistierende Inflammation eine Folge der fehlenden IL-10-Sekretion sei [173]. Über die Wirkung von 3-HAA auf Epithelzellen ist aktuell noch wenig bekannt. *Wang* et al. fanden jedoch heraus, dass 3-HAA die Expression von Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP2) in vaskulären glatten Muskelzellen über den NF- $\kappa$ B -Signalweg induzieren [174]. Eine erhöhte Expression von MMP2 wiederum ist mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert [175]. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass ein deregulierter

Tryptophanstoffwechsel und die Produktion von biologisch aktiven Tryptophan-metaboliten Einfluss auf die Pathogenese von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen nehmen könnte. Über den Zusammenhang des Tryptophan-stoffwechsels und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen soll der nächste Abschnitt Aufschluss geben.

## **2.7 Tryptophanstoffwechsel und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen**

Im Jahr 2017 wies eine Arbeitsgruppe aus Kiel innerhalb einer klinischen Studie von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (> 500 Patienten) eine signifikante Veränderung des systemischen Tryptophanstoffwechsels nach. Die Autoren stellten fest, dass sowohl bei Morbus Crohn als auch bei Colitis ulcerosa Patienten ein Abfall in der systemischen Tryptophankonzentration zu beobachten war. Erstaunlicherweise blieb jedoch ein Anstieg der systemischen Kynureninkonzentration aus. Parallel hierzu wiesen die Autoren im entzündeten Gewebe eine erhöhte Expression der IDO1 mRNA Expression nach. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen beschrieben weitere Studien eine Infiltration von IDO1+ APCs (hauptsächlich DCs und Makrophagen) in entzündete Regionen des GI-Traktes [176,177]. Ungeklärt ist, auf welcher Grundlage die verminderte systemische Tryptophankonzentration, das Ausbleiben veränderter systemischer Kynureninspiegel sowie die Infiltration von IDO1+ Immunzellen in entzündete Regionen des GI-Traktes, basieren. Somit bleibt unklar, 1) ob IDO1 in einem aktivierten Zustand exprimiert wird, 2) wie hoch die lokalen Tryptophanmetabolitkonzentrationen in der Mukosa sind und 3) wie der weitere Abbau von Kynurenin zu Tryptophan-abwärts gerichteten Metaboliten reguliert wird. Zudem ist nicht geklärt, ob Tryptophanmetabolite aufgrund ihrer Akkumulierung nach Expressionsveränderungen in verschiedenen Krankheitsstadien als Biomarker zur exakten Differenzierung von Subtypen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen geeignet sind.



## 2.8 Fragestellung

Das sehr unterschiedliche therapeutische Ansprechen von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wirft nach wie vor Fragen hinsichtlich der Heterogenität der pathologischen Mechanismen auf, die das Fortschreiten der Krankheit begünstigen. Hilfreich für eine Therapieverbesserung ist eine exakte Diagnosestellung z.B. durch die Identifikation von neuen Biomarkern. Deshalb lag der Fokus dieser Arbeit auf der Identifizierung potenzieller Biomarker und Biomarker-Signaturen im Zusammenhang mit dem Tryptophanstoffwechsel in Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. Basierend auf den Ergebnissen von Nikolaus et al. [178] sollte die Analyse von Enzymen und Metaboliten des Tryptophanstoffwechsels einen Schwerpunkt einnehmen. Im Detail sollte sowohl der systemische im Blut als auch der lokale im Gewebe lokalisierte Tryptophanstoffwechsel untersucht und Assoziationen zum Immunmetabolismus dargestellt werden. Im Mittelpunkt der Analysen stand der Nachweis der Enzymexpressionen von IDO1 und KYNU mittels immunhistochemischen und mRNA basierten Screenings sowie der beiden Tryptophanfolgemetabolite Kynurenin und 3-HAA mittels LC-MS/MS und ELISA. Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit *ex vivo* Untersuchungen von Probenmaterial aus Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, sowie Untersuchungen in einem murinen Modell der Darmentzündung. Der zweite Teil schließt daran mit *in vitro* Daten an und soll anhand von mRNA-basierten Einzelzellscreenings primärer humaner Immunzellen sowie humaner intestinaler Epithelzelllinien die inflammationsbedingten Tryptophanmetabolitströme untersuchen. Außerdem soll dieses Einzelzellscreening zu einem Gesamtüberblick der zell-spezifischen Enzymexpressionen des Tryptophanstoffwechsels beitragen, sowie mit Hilfe der Untersuchung von intestinalen Krebszelllinien, den Einfluss der Inflammation auf die Tryptophan-assoziierte Kanzerogenese aufzeigen.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Humanes Material von gesunden Probanden und Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen**

Die in dieser Arbeit untersuchten humanen Plasma-, Stuhl-, Urin-, sowie Gewebeproben von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) wurden aus unterschiedlichen Instituten und Zentren akquiriert. Eine detaillierte Identifizierung des humanen Materials, die Auswahlkriterien geeigneter Probanden und Patienten, die dazugehörigen Ethikvoten, sowie der Umgang mit frisch akquiriertem Material werden im Folgenden ausgeführt.

##### **3.1.1.1 Plasma-, Urin- und Stuhlproben aus dem Interdisziplinären Crohn Colitis Centrum Frankfurt – CED-Patientenkohorte-Frankfurt**

Humane Plasma-, Urin- und Stuhlproben von gesunden Probanden und Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wurden in Kooperation mit dem Interdisziplinären Crohn Colitis Centrum (iCCC) Frankfurt unter Führung des leitenden Gastroenterologen Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Stein akquiriert. Für die vorliegende Arbeit wird die gesamte Kohorte, welche sowohl Probanden als auch Patienten inkludiert, als CED-Patientenkohorte-Frankfurt bezeichnet.

##### **3.1.1.2 Auswahlkriterien der Probanden und Patienten zur Akquise von humanen Plasma-, Urin- und Stuhlproben aus dem Interdisziplinären Crohn Colitis Centrum Frankfurt – CED-Patientenkohorte-Frankfurt**

Die Auswahl der gesunden Probanden und Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen erfolgte durch den leitenden Gastroenterologen des Interdisziplinären Crohn Colitis Centrum Frankfurt Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Stein. Es wurden nur Probanden und Patienten involviert, welche das 18. Lebensjahr erreicht, sowie den zur Studie passenden Einwilligungsbogen ausgefüllt hatten. Die Probanden und Patienten sollten zum Zeitpunkt der Probenentnahme nicht an anderen klinischen Studien teilgenommen haben. Schwangere Frauen waren von der Teilnahme an der

Studie ausgeschlossen. Probanden wurden definiert als Personen, die im Rahmen der Darmkrebs-Früherkennung untersucht wurden, aber weder Symptome noch Polypen oder entzündliche Läsionen aufwiesen. Herr Prof. Dr. Dr. Jürgen Stein sorgte für die Einhaltung aller durch die Landesärztekammer Frankfurt vorgeschriebenen Regularien und die eindeutige Aufklärung der Probanden und Patienten. Zudem erstellte Prof. Dr. Dr. Jürgen Stein anhand eines krankheitsspezifischen Scorings eine eindeutige Befundung der Patienten. Die Befundung enthielt für alle Patienten eine Montreal Klassifizierung (siehe Abschnitt 3.2.1.2), für Morbus Crohn Patienten die krankheitsspezifischen Scores *Harvey-Bradshaw-Index* (HBI) und *Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity* (CDEIS), sowie für Colitis ulcerosa Patienten den *Mayo Score*. Eine ausführliche Beschreibung der krankheitsspezifischen Scores ist unter Abschnitt 3.2.1.1 aufgeführt. Alle erhobenen Daten der Probanden und Patienten wurden pseudonymisiert. Stuhlproben wurden sofort nach Abgabe durch die gesunden Probanden und Patienten auf Trockeneis gelagert und bei -80°C für die späteren Analysen weggefroren. Blut und Urin wurden entnommen, zentrifugiert (750 g, RT) und bei -80°C gelagert. Es wurde darauf geachtet beim Transport des humanen Materials die Kühlkette nicht zu unterbrechen. Die Probenentnahme erfolgte im Interdisziplinären Crohn Colitis Centrum Frankfurt. Alle weiteren Aufarbeitungs- und Analyseschritte wurden im Labor der Immunpharmakologie Frankfurt, den LC-MS/MS Laboratorien in Mannheim (Prof. Dr. Weller, Hochschule Mannheim) oder Olomouc (Dr. Henykova, *Czech Academy of Sciences*) durchgeführt.

### **3.1.1.3 Ethikvotum – CED-Patientenkohorte-Frankfurt**

Das Ethikvotum wurde von der Ethik-Kommission der Landesärztekammer Hessen unter dem Kennzeichen FF40/2017 am 04.09.17 erteilt. Alle Arbeiten wurden in Übereinstimmung mit den Vereinbarungen von Helsinki durchgeführt.

### **3.1.1.4 Intestinale Gewebeproben der Pathologie Bayreuth – CED Patientenkohorte Bayreuth**

Humane Formalin-fixierte und in Paraffin-eingebettete (FFPE) Gewebeproben von gesunden Probanden und Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

wurden in Kooperation mit der Pathologie Bayreuth unter Leitung des Pathologen Prof. Dr. Michael Vieth akquiriert. Für die vorliegende Arbeit wird die gesamte Kohorte, die sowohl Gewebeproben von Probanden als auch von Patienten inkludiert, als CED-Patientenkohorte-Bayreuth bezeichnet.

#### **3.1.1.5 Auswahlkriterien zur Akquise von humanen intestinalen Gewebeproben der Pathologie Bayreuth – CED-Patientenkohorte Bayreuth**

Die Auswahl der Gewebeproben von gesunden Probanden und Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen erfolgte durch den leitenden Pathologen der Pathologie Bayreuth Herrn Prof. Dr. Michael Vieth. Es wurden nur Probanden und Patienten involviert, welche das 18. Lebensjahr erreicht, sowie den zur Studie passenden Einwilligungsbogen ausgefüllt hatten. Außerdem sollten die Probanden und Patienten zum Zeitpunkt der Probenentnahme nicht an anderen Studien teilgenommen haben. Schwangere Frauen waren von der Teilnahme an der Studie ausgeschlossen. Probanden wurden definiert als Personen, die im Rahmen der Darmkrebs-Früherkennung untersucht wurden, aber weder Symptome noch Polypen oder entzündliche Läsionen aufwiesen. Zudem erstellte Prof. Dr. Michael Vieth anhand eines histologischen Scorings eine eindeutige Befundung des Gewebematerials. Die Befundung wurde mit Hilfe des Riley Scores durchgeführt und gab Aufschluss über den Grad der intestinalen Entzündung. Eine ausführliche Beschreibung des Riley Scores ist unter Abschnitt 3.2.1.3 aufgeführt. Alle erhobenen Daten der Probanden und Patienten wurden anonymisiert. In die Probandenkohorte wurden lediglich Gewebeproben mit einem Riley Score von 0 inkludiert, wohingegen Gewebeproben von Patienten eine aktive intestinale Inflammation aufweisen mussten und somit einen Riley Score von mindestens 2 vorzuweisen hatten. Die Einbettung in Paraffin der FFPE intestinalen Gewebeproben erfolgte in der Pathologie Bayreuth. Anschließend wurden das Gewebe als FFPE Blöcke an die Immunpharmakologie Frankfurt für die weiteren immunhistochemischen Analysen verschickt.

### **3.1.1.6 Ethikvotum – CED-Patientenkohorte-Bayreuth**

Das Ethikvotum wurde von der Ethik-Kommission der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg unter dem Kennzeichen 309\_19 Bc am 23.10.19 erteilt. Alle Arbeiten wurden in Übereinstimmung mit den Vereinbarungen von Helsinki durchgeführt.

### **3.1.1.7 Auswahlkriterien zur Akquise von humanen intestinalen Gewebeproben von Krebspatienten des Universitären Centrums für Tumorerkrankungen Frankfurt**

Es wurden kryokonservierte Proben und FFPE-Material von Krebspatienten, welche zuvor als Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa Patient diagnostiziert wurden, akquiriert. Beantragt wurden bei der Biobank des Universitären Centrums für Tumorerkrankung (UCT) Frankfurt Ileum- und Kolonkarzinomproben. Für jede Entität wurden 10 Fälle (jeweils Tumor und angrenzendes Normalgewebe) jeder Materialart bereitgestellt. Die anschließenden Untersuchungen werden lediglich mit Material und Daten von Patienten durchgeführt, die Ihr Einverständnis zu deren Verwendung im Rahmen der UCT Biobank erteilt haben. Dadurch wurden die geplanten Untersuchungen abgedeckt. Alle erhobenen Daten der Patienten wurden anonymisiert.

### **3.1.1.8 Ethikvotum – Universitäres Centrums für Tumorerkrankungen Frankfurt**

Das Ethikvotum wurde von der Ethikkommission des Fachbereiches Medizin der Goethe Universität Frankfurt unter dem Kennzeichen SGI-5-2018 am 04.10.2018 erteilt. Alle Arbeiten wurden in Übereinstimmung mit den Vereinbarungen von Helsinki durchgeführt.

## **3.1.2 Murines Material**

### **3.1.2.1 Tierstamm, Haltung und Präparation**

Zur Akquise murinen Materials wurden 8-9 Wochen alte weibliche Mäuse des Stammes C57BL/6 verwendet. Der Inzucht-Mausstamm C57BL/6 wurde 1921 von

C.C. Little, Jackson Laboratories, erstellt. Die Tiere sind zu >99% genetisch identisch und ihr Genom ist vollständig sequenziert und veröffentlicht [179]. Die Mäuse wurden durch Frau Monika Bayer (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Urs Christen, *pharmazentrum frankfurt*, Deutschland) bei *mfd Diagnostics GmbH* (Mainz, Deutschland) kreuzverpaart. Danach wurden die Mäuse in die Zentrale Forschungseinrichtung der Goethe Universität Frankfurt verschickt und unter den gesetzlichen Bedingungen des Tierschutzgesetzes Deutschland gehalten und betreut. Die Induktion der intestinalen Inflammation, sowie die Präparation der Tiere erfolgte ebenfalls in der Zentralen Forschungseinrichtung der Goethe Universität Frankfurt. Das retrobulbär gewonnene Blutplasma wurde nach anschließender Zentrifugation (750 g, RT) bei -80°C in der Immunpharmakologie Frankfurt weggefroren und gelagert. Zu späterem Zeitpunkt wurde das Plasma mittels LC-MS/MS in Olomouc (Dr. Henykova, *Czech Academy of Sciences*) untersucht.

### **3.1.2.2 Versuchstierantrag zur Akquise murinen Materials**

Die Bewilligung des Versuchstierantrages erfolgte durch das Regierungspräsidium Darmstadt unter dem Aktenzeichen FU\_1053\_S1P im Mai 2015.

## **3.1.3 Zellen**

### **3.1.3.1 Intestinale Epithelzelllinien**

#### **3.1.3.1.1 CCD 841 CoN Zellen**

Bei der intestinalen humanen Kolonzelllinie CCD 841 CoN (*American Type Culture Collection*; ATCC no.: CRL-1790™) handelt es sich um adhärente epitheliale Zellen eines 21 Wochen alten weiblichen Fötus. Die Zellen verfügen über einen diploiden Chromosomensatz und weisen keinerlei Hinweise einer Vorerkrankung auf. Sie wurden 1985 durch A. Thomson in der *American Type Culture Collection* (Rockville, USA) entwickelt [180]. Die Kultivierungsbedingungen von CCD 841 CoN Zellen sind unter dem Abschnitt 3.2.3.5 aufgeführt. In dieser Arbeit wurde die Zelllinie CCD 841 CoN als Modellsystem für normale epitheliale Kolonzellen verwendet.

#### **3.1.3.1.2 CaCo-2 Zellen**

Bei der intestinalen humanen Krebszelllinie CaCo-2 (zugesandt durch Dr. Manfred Schmolz, Hot Screen GmbH, Reutlingen, Deutschland) handelt sich um heterogene adhärenzte epitheliale Zellen eines Patienten mit Kolorektalem Adenokarzinom. Die Zelllinie wurde in den späten 1980er durch I. Hidalgo im *Memorial Sloan-Kettering-Institute for Cancer Research* (New York, USA) entwickelt [<sup>181</sup>]. CaCo-2 Zellen können unter spezifischen Konditionen zu Enterozyten ausdifferenzieren, welche anhand von morphologischen und phänotypischen Charakteristika, sowie anhand der Funktionalität als Zellsystem zur Untersuchung des Dünndarms-Epithels dienen können. Nicht-ausdifferenzierte CaCo-2 Zellen werden zur Untersuchung des Dickdarm-Epithels (Kolon) verwendet. Die Kultivierungsbedingungen von CaCo-2 Zellen sind unter dem Abschnitt 3.2.3.5 aufgeführt. In dieser Arbeit wurden ausschließlich nicht-ausdifferenzierte CaCo-2 Zellen verwendet und somit als Modell zur Untersuchung des Dickdarm-Epithels betrachtet.

#### **3.1.3.1.3 DLD-1 Zellen**

Bei der intestinalen humanen Krebszelllinie DLD-1 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; DSMZ no.: ACC 278) handelt es sich um adhärenzte epitheliale Zellen eines Patienten mit Kolorektalem Adenokarzinom. Die Zelllinie wurde zwischen 1977 – 1979 von D.L. Dexter im *Roger Williams General Hospital* der *Brown University* (Rhode Island, USA) entwickelt [<sup>182,183</sup>]. Anders als die in Abschnitt 3.1.3.1.2 beschriebenen CaCo-2 Zellen, besitzen DLD-1 Zellen nicht die Fähigkeit zu Enterozyten des Dünndarms auszudifferenzieren und werden spezifisch zur Untersuchung des Dickdarm-Epithels (Kolon) verwendet. Die Kultivierungsbedingungen von DLD-1 Zellen sind unter dem Abschnitt 3.2.3.5 aufgeführt.

#### **3.1.3.1.4 Primäre humane Immunzellen**

Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) aus *Buffy Coats* wurden von anonymen gesunden Spendern des Deutschen-Roten-Kreuzes-Blutspendedienstes Baden-Württemberg-Hessen (Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie Frankfurt am Main, Frankfurt, Deutschland) isoliert. Die Spender erhielten eine

ausführliche Aufklärung über mögliche Risiken, sowie Anonymisierung aller personenbezogenen Daten und bestätigten diese anhand einer schriftlichen Einwilligung. Für die Isolation von PBMCs aus *Buffy Coats* des Deutschen-Roten-Kreuzes-Blutspendedienstes Baden-Württemberg-Hessen war kein zusätzliches Ethikvotum erforderlich. Gesammelte Daten von Spendern beinhalteten lediglich Geschlecht und Alter.

### 3.1.4 Labormaterial

#### 3.1.4.1 Antikörper

Alle Antikörper (Tabelle 2) wurden bei 4°C gelagert und für die Immunhistochemie (IHC), das *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) sowie die Immunfluoreszenz (IF) verwendet. Primäre Antikörper wurden für die Detektion von humanen Antigenen verwendet. Sekundäre Antikörper wurden für die Detektion der jeweiligen 1. Antikörper eingesetzt.

**Tabelle 2: Antikörper**

Antigen	Klon	Spezies	Fluorochrom	Hersteller
3-HAA	5B2-G2	Maus		ImmuSmol (Bordeaux, Frankreich)
CD3	F7.2.38	Maus		ThermoFisher (Rockford, USA)
CD8	C8/468	Maus		Abcam (Cambridge, Großbritannien)
CD11b	PA5-29633	Kaninchen		ThermoFisher (Rockford, USA)
CD11c	CL1831	Maus		Atlas Antibodies AB (Bromma, Schweden)
CD68	KP1	Maus		Abcam (Cambridge, Großbritannien)
FoxP3	236A/E7	Maus		Abcam (Cambridge, Großbritannien)
IDO1	EPR20374	Kaninchen		Abcam (Cambridge, Großbritannien)
KMO	8564	Kaninchen		Novus Biologicals (Centennial, USA)



KYNU	HPA031686	Kaninchen		Atlas Antibodies AB (Bromma, Schweden)
Kynurenin	3D4-F2	Maus		ImmuSmol (Bordeaux, Frankreich)
MPO	A0398	Kaninchen		Dako (Santa Clara, USA)
TDO2	OT12A4	Maus		ThermoFisher (Rockford, USA)
Anti-Maus IgG (2.AK, Polymer)		Ziege		Nichirei Biosciences Inc. (Tokyo, Japan)
Anti-Kaninchen IgG (2.AK, Polymer)		Ziege		Nichirei Biosciences Inc. (Tokyo, Japan)
CD2/CD3/CD28				Stemcell Technologies (Köln, Deutschland)
CD3	HIT3a	Maus	FITC	Biolegend (San Diego, USA)
CD4	OKT4	Maus	APC	Biolegend (San Diego, USA)
CD8	RPA-T8	Maus	V450	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
FC-Block				BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
anti-Maus IgG (2. AK)	Poly4064	Esel	V510	Biolegend (San Diego, USA)
anti-Kaninchen IgG (2.AK)		Esel	Alexa-Fluor 488	ThermoFisher (Rockford, USA)
anti-Maus IgG (2.AK)		Esel	Alexa-Fluor 594	ThermoFisher (Rockford, USA)

3-HAA = 3-Hydroxyanthranilsäure, APC = Allophycocyanin, FITC = Fluorescein, FoxP3 = *Forkhead-Box-Protein* P3, IDO1 = Indolamin-2,3-Dioxygenase 1, KMO = Kynurenin-3-Monooxygenase, KYNU = Kynureninase, MPO = Myeloperoxidase, TDO2 = Tryptophan-2,3-Dioxygenase

### 3.1.4.2 Interleukine und Stimuli

Alle Interleukine und Stimuli (Tabelle 3) wurden in der höchsten Reinheit und Zellkultur-zertifiziert verwendet. Die Interleukine wurden in lyophilisiertem Zustand geliefert und zu einer Konzentration von 10 µg/ml in PBS/ 0,1% BSA rekonstituiert. Gelagert wurden die Interleukine und Stimulanzen bei -80°C gemäß den Empfehlungen des Herstellers.

**Tabelle 3: Interleukine und Stimulanzen**

Stimulus	Hersteller
GM-CSF	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
IFN $\gamma$	Peptotech (Hamburg, Deutschland)
IL-1 $\beta$	Peptotech (Hamburg, Deutschland)
IL-2	Peptotech (Hamburg, Deutschland)
IL-4	Peptotech (Hamburg, Deutschland)
Ionomycin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
LPS	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
PMA	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
TNF $\alpha$	Peptotech (Hamburg, Deutschland)

GM-CSF = Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor, IFN $\gamma$  = Interferon  $\gamma$ , IL = Interleukin, LPS = Lipopolysaccharide, PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat, TNF $\alpha$  = Tumornekrosefaktor  $\alpha$

### 3.1.4.3 Kits

Alle Kits (Tabelle 4) wurden nach Herstellerangaben gelagert und verwendet.

**Tabelle 4: Kits**

Kit	Hersteller
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories Inc. (Burlingame, USA)
DAB Peroxidase Substrat Kit SK-4100	Vector Laboratories Inc. (Burlingame, USA)
EasySep™ CD8+ T cell negative selection Kit	Stemcell Technologies (Köln, Deutschland)
EasySep™ Human T Cell Isolation Kit	Stemcell Technologies (Köln, Deutschland)
EasySep™ Human Monocyte Enrichment Kit without CD16 Depletion	Stemcell Technologies (Köln, Deutschland)
EasySep™ Human B Cell Isolation Kit	Stemcell Technologies (Köln, Deutschland)
FoxP3 Staining Buffer Set	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	ThermoFisher (Rockford, USA)

IDK® Tryptophan high sensitive ELISA	Immundiagnostik (Bensheim, Deutschland)
IDK® Kynurenin high sensitive ELISA	Immundiagnostik (Bensheim, Deutschland)
peqGOLD Total RNA Kit	PEQLAB (Erlangen, Deutschland)

DAB = Diaminobenzidin

#### 3.1.4.4 Quantitative mRNA Bestimmung (TaqMan Assay)

5'FAM-markierte TaqMan-Sonden, die spezifisch für die Zielgene in Tabelle 5 sind, wurden bei -20°C gelagert und in einer Endkonzentration von 250 nM in einem vollständigen Reaktionsgemisch unter Verwendung des iTaq Universal Sonden Supermix (BioRad, Hercules, USA) eingesetzt

**Tabelle 5: TaqMan Sonden für die quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)**

Gen	Katalognummer	Hersteller
3-HAAO	Hs00895710_m1	Applied biosystems (Waltham, USA)
ACTB	62126	Primerdesign (Southampton, Großbritannien)
AhR	Hs00169233_m1	Applied biosystems (Waltham, USA)
GAPDH	Hs02758991_g1	Applied biosystems (Waltham, USA)
GCN2	Hs01010957_m1	Applied biosystems (Waltham, USA)
GPR35	Hs00271114_s1	Applied biosystems (Waltham, USA)
IDO1	Hs00984148_m1	Applied biosystems (Waltham, USA)
IDO2	Hs01589373_m1	Applied biosystems (Waltham, USA)
KAT1	Hs00187858_m1	Applied biosystems (Waltham, USA)
KAT2	Hs00212039_m1	Applied biosystems (Waltham, USA)
KAT3	Hs00219725_m1	Applied biosystems (Waltham, USA)
KMO	Hs00175738_m1	Applied biosystems (Waltham, USA)
KYNU	Hs01114105_m1	Applied biosystems (Waltham, USA)
RPL13A	Hs01578912_m1	Applied biosystems (Waltham, USA)
TDO2	Hs00194611_m1	Applied biosystems (Waltham, USA)

3-HAAO = 3-Hydroxyanthranilat-3,4-Dioxygenase, ACTB =  $\beta$ -Aktin, AhR = Arylhydrocarbonrezeptor, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, GCN2 = *General control nonderepressible 2*, GPR35 = *G protein-coupled receptor 35*, IDO1 = Indolamin-2,3-Dioxygenase 1, IDO2 = Indolamin-2,3-

Dioxygenase 2, KAT = Kynureninaminotransferase, KMO = Kynurenin-3-Monooxygenase, KYNU = Kynureninase, RPL13A = Ribosomal Protein L13a, TDO2 = Tryptophan-2,3-Dioxygenase

### 3.1.4.5 Medien und Puffer

Zellkulturmedien (Tabelle 6) wurden bei 4°C gelagert und über einen Zeitraum von bis zu sechs Wochen verwendet. Alle Zellkulturmedien wurden von ThermoFisher (Waltham, USA) bezogen. Puffer (Tabelle 7) wurden bei 4°C oder nach Herstellerangaben gelagert.

**Tabelle 6: Auflistung der Zellkulturmedien für die primären Immunzellen und intestinale Zelllinien**

Zellen	Medium	Zusätze	Hersteller
PBMCs	RPMI 1640 + Glutamax	50 mM $\beta$ -Mercaptoethanol	ThermoFisher (Waltham, USA)
B Zellen		1 mM Natriumpyruvat	ThermoFisher (Waltham, USA)
CD3+ T Zellen		100 $\mu$ g/ml Streptomycin	ThermoFisher (Waltham, USA)
CD8+ T Zellen		100 IU/ml Penicillin	ThermoFisher (Waltham, USA)
Dendritische Zellen		25 mM HEPES	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Makrophagen		1% humanes AB Serum	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Monozyten			
CaCo-2	MEM	10% FCS	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
CCD 841 CoN		100 $\mu$ g/ml Streptomycin	ThermoFisher (Waltham, USA)
DLD-1	DMEM	100 IU/ml Penicillin	ThermoFisher (Waltham, USA)

FCS = Fetales Kälberserum, HEPES = Hydroxyethylpiperazinylethanosulfonsäure, PBMC = Periphere mononukleäre Blutzellen

**Tabelle 7: Auflistung der eingesetzten Puffer**

Puffer	Zusätze	Hersteller
Antibody Diluent with Background Reducing Components	Ready-to-use	DAKO (Carpinetría, USA)
EasySep™ buffer	1x PBS	ThermoFisher (Waltham, USA)
	2% BSA	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

	2 mM EDTA	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
FCS Buffer	1x PBS	ThermoFisher (Waltham, USA)
	1% FCS	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
	0.1% NaN <sub>3</sub>	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Durchflusszytometrie (FACS) Fixierungspuffer	1x PBS	ThermoFisher (Waltham, USA)
	1% FCS	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
	0.1% NaN <sub>3</sub>	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
	1% Paraformaldehyd	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
10x PBS	4.3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	1.4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
	137 mM NaCl	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	2.7 mM KCl, pH 7.3	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Protein Block Serum free	Ready-to-use	DAKO (Carpinteria, USA)
10x Target Retrieval Solution (Citrat Puffer)	Ready-to-use	DAKO (Carpinteria, USA)

BSA = Bovines Serumalbumin, EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure, FCS = fetales Kälberserum, KCl = Kaliumchlorid, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = Kaliumhydrogenphosphat, NaCl = Natriumchlorid, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> = Dinatriumhydrogenphosphat, NaN<sub>3</sub> = Natriumazid, PBS = Phosphatgepufferte Salzlösung

### 3.1.4.6 Chemikalien

Alle Chemikalien (Tabelle 8) wurden bei Raumtemperatur oder 4°C gemäß den in den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern angegebenen Anweisungen des Herstellers gelagert.

**Tabelle 8: Auflistung der eingesetzten Chemikalien**

Substanz	Hersteller
3-HAA	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]-3-HAA	Toronto Research Chemicals (North York, Kanada)

DAPI	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DMSO	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
DSS	MP Biomedicals (Eschwege, Deutschland)
Ethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Hämatoxylin	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Histopaque®-1077	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Kynurenin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
[ <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]-Kynurenin	Cambridge Isotope Laboratories (Tewksbury, USA)
Methanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Roti®-Mount Aqua	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Trypsin/EDTA	ThermoFisher (Waltham, USA)
Tryptanblau	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Xylol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

3-HAA = 3-Hydroxyanthranilsäure, DMSO = Dimethylsulfoxid, DSS = Dextransulfat-Natrium, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Wasserstoffperoxid

### 3.1.4.7 Geräte und Software

Geräte (Tabelle 9) und Software (Tabelle 10) wurden vom *pharmazentrum frankfurt* zur Verfügung gestellt oder standen in den entsprechenden LC-MS/MS Laboratorien in Mannheim (Prof. Dr. Weller, Hochschule Mannheim) oder Olomouc (Dr. Henykova, *Czech Academy of Sciences*).

**Tabelle 9: Laborgeräte**

Gerät	Gerätname	Hersteller
Dampfgarer	Multi Gourmet	Braun (Kronberg, Deutschland)
Durchflusszytometer	FACS Canto II	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Konfokales Mikroskop	LSM 510 Meta	Zeiss (Jena, Deutschland)
Lichtmikroskop	Axio Vert 25	Zeiss (Jena, Deutschland)
Massenspektrometer	BX60	Olympus (Hamburg, Deutschland)
	Acquity UPLC® System	Waters Corporation (Milford, USA)
	Xevo® TQ	Waters Corporation (Milford, USA)

Mikrotom	RM2235	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Neubauer Zählkammer		Hecht Assistent® (Sondheim vor der Rhön, Deutschland)
PCR Thermocycler	Tpersonal	Biometra (Göttingen, Deutschland)
qPCR System	7500 Fast System	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Spektrophotometer	ND-1000 UV/Vis	NanoDrop Technologies (Wilmington, USA)
Vortex Mixer	Reax top	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Zentrifuge	Heraeus Rico 17	Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
	Biofugefresco	Hermle Labortechnik (Wehingen, Deutschland)
	Z513K	Kern&Sohn GmbH (Balingen, Deutschland)

**Tabelle 10: Software**

Software	Hersteller
7500 Fast System 2.0.6	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
BZ Analyzer II	Keyence (Osaka, Japan)
CellSence Entry	Olympus (Hamburg, Deutschland)
FACS Diva 6.1.3	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
FlowJo 7.6.5	Tree Star (Ashland, USA)
GraphPad Prism 6	GraphPad Software Inc. (La Jolla, USA)
MassLynx™ 4.2	Waters Corporation (Milford, USA)
Mendeley 1.19.3	Elsevier (Amsterdam, Niederlande)
Microsoft Office 2016	Microsoft (Unterschleißheim, Deutschland)
MO.Affinity Analysis	NanoDrop Technologies (Wilmington, USA)
NanoDrop 3.1.0	NanoDrop Technologies (Wilmington, USA)
Photoshop 11.0	Adobe (San Jose, USA)
Soft Max Pro 5	GSL Biotech LLC (Chicago, USA)
TargetLynx™ 4.2	Waters Corporation (Milford, USA)
ZEN 2.1	Zeiss (Jena, Deutschland)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Humane *ex vivo* Versuche

#### 3.2.1.1 Erstellung der klinischen-endoskopischen Scores *Harvey-Bradshaw-Index*, *Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity* und *Mayo Score* zur Charakterisierung von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen – CED-Patientenkohorte Frankfurt

Um eine Objektivierung der Aktivität und Schwere der Erkrankung von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen gewährleisten zu können, wurde für die CED-Patientenkohorte-Frankfurt (siehe Abschnitt 3.1.1.2) klinische und endoskopische Scores erstellt. Bei Morbus Crohn Patienten wurde neben dem *Harvey-Bradshaw-Index* (HBI) [86,87] der *Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity* (CDEIS) [88] erstellt. Der HBI inkludiert Informationen über das Allgemeinbefinden (0 = gut, 1 = beeinträchtigt, 2 = schlecht, 3 = sehr schlecht, 4 = unerträglich), die Schwere der Bauchschmerzen (0 = keine, 1 = leicht, 2 = mittel, 3 = stark), die Anzahl ungeformter Stuhlgänge pro Tag (1 pro Stuhlgang), die abdominale Resistenz (0 = nein, 1 = fraglich, 2 = sicher, 3 = sicher und schmerzhaft) sowie die Anzahl an neuen Komplikationen. Komplikationen sind u.a. Arthralgien, eine Uveitis, eine Iritis, ein Erythema nodosum, ein Pyoderma gangraenosum, orale Aphthen, Analfissuren, neue Fisteln oder Abszesse. Bei gesunden Probanden lag ein HBI von 0 vor. Patienten in Remission wiesen einen HBI von 1-6 auf. Aktive bis hochaktive Morbus Crohn Patienten zeigten einen HBI ab 7. Der CDEIS ist der meist eingesetzte Score unter den endoskopischen Aktivitätsbeurteilungen. Es wurde sowohl die betroffene und auffällige Region (Dünndarm, Dickdarm) in das Scoring miteinbezogen, als auch die Art der Ulzeration bzw. Läsion (tiefe Ulzeration 0-12 Punkte, oberflächliche Ulzeration 0-6 Punkte, Ausdehnung Ulzeration 0-10 cm, Ausdehnung Läsion 0-10 cm). Die einzelnen Scores wurden addiert und durch die Anzahl beurteilter Segmente (zwischen 1 und 5) geteilt. Im Weiteren konnten noch zweimal 3 Punkte addiert werden, wenn ulzerierte bzw. nicht ulzerierte Stenosen nachweisbar waren. Ein CDEIS unter 6 identifiziert eine endoskopische Remission, ein CDEIS unter 4 eine Mukosaheilung. Liegt ein CDEIS ab 7 vor, handelt es sich um eine aktive Erkrankung. Für Colitis ulcerosa Patienten wurde der Mayo Score [84] erstellt. Der Mayo Score beinhaltet Informationen über die Stuhlfrequenz pro Tag (0 = normal, 1-2 Stühle = 1,



3-4 Stühle = 2, >5 = 3) den rektalen Blutabgang (kein Blut = 0, Blutstreifen bei weniger als 50% der Stühle = 1, deutliche Blutbeimengung = 2, Blut ohne Stuhl = 3), endoskopische Befunde (normaler Befund oder inaktive Erkrankung = 0, Erythem mit leicht spröder Schleimhaut = 1, deutliches Erythem mit Erosionen und Gefäßmuster verschwunden = 2, Ulzerationen mit spontaner Blutungen = 3) sowie die globale Beurteilung des Arztes (normal = 0, milde Erkrankung = 1, moderate Erkrankung = 2, schwere Erkrankung = 3). 2 (bis 2 Remission) bis 5 Punkte entsprachen einer milden, ab 6 Punkte einer moderaten bis schweren Erkrankung.

### **3.2.1.2 Erstellung der Montreal Klassifizierung zur Charakterisierung von Subtypen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen – CED-Patientenkohorte Frankfurt**

Für die CED-Patientenkohorte-Frankfurt (siehe Abschnitt 3.1.1.2) wurde neben den klinischen Scores welche unter dem Abschnitt 3.2.1.1 aufgeführt sind, eine Montreal Klassifizierung [69,70] durchgeführt, um eine Kategorisierung in chronisch-entzündliche Darmerkrankungen assoziierte Subtypen durchführen zu können. Eine Montreal Klassifizierung kategorisiert Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen nach betroffener Region der Inflammation. Während bei Colitis ulcerosa Patienten lediglich das Kolon und das Rektum von einer Inflammation betroffen sein können, können bei Morbus Crohn Patienten auch Regionen außerhalb des GI-Traktes betroffen sein. Bei Morbus Crohn Patienten wird zwischen den Typen L1 – L4 klassifiziert. L1 kennzeichnet eine Inflammation ausschließlich des terminalen Ileums, L2 kennzeichnet Inflammationen ausschließlich im Kolon, L3 kennzeichnet einen Befall sowohl des terminalen Ileums als auch des Kolons und L4 kennzeichnet einen Befall des oberen GI-Traktes. In besonders schweren Fällen kann ein L4+ Subtyp vorliegen. Hierbei ist sowohl der obere GI-Trakt als auch das Ileum und Kolon von einer Inflammation betroffen. Bei Colitis ulcerosa Patienten wird nach den Subtypen E1 – E3 klassifiziert. Der E1 Subtyp wird als Proktitis bezeichnet. Hierbei ist besonders das Rektum von einer Entzündung betroffen. Beim E2 Subtyp handelt es sich um eine Linksseitenkolitis. Neben dem Rektum sind auch Regionen des Kolons von der Inflammation betroffen. Der schwerste Krankheitsverlauf ist als E3 gekennzeichnet. Hierbei kann sich eine Inflammation über den gesamten Bereich des Kolons und

Rektums ausbreiten. In äußerst seltenen Fällen kann sich die Inflammation sogar auf das Ileum ausdehnen. Dieser Befall des Ileums bei Colitis ulcerosa Patienten wird als *Backwash-Ileitis* bezeichnet.

### **3.2.1.3 Erstellung des Riley Scores zur Befundung humaner intestinaler Gewebeproben von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen – CED-Patientenkohorte-Bayreuth**

Zur Identifizierung geeigneter intestinaler Gewebeproben innerhalb der CED-Patientenkohorte-Bayreuth (siehe Abschnitt 3.1.1.4) wurde der Riley Score erstellt [90]. Die Befundung erfolgte in der Pathologie Bayreuth. Der Riley Score beinhaltet sechs Kriterien, welche jeweils mit einem Scoring zwischen 0 bis 3 (0 = keine Auffälligkeiten, 1 = schwache Auffälligkeiten, 2 = moderate Auffälligkeiten, 3 = schwere Auffälligkeiten) zu befunden sind. Die sechs Kriterien setzten sich zusammen aus der Infiltration polymorphkerniger Leukozyten in die Lamia Propria, Abszessen der Krypten, Abbau von Mucinen, Störung der Integrität der epithelialen Oberfläche, der Infiltration chronisch inflammatorischer Zellen in die Lamia Propria sowie Anzeichen von Irregularitäten in der Kryptenarchitektur. Diese einzelnen Befundungen werden als zusammengefasster Riley Score dargestellt und der Grad der mukosalen Inflammation klassifiziert. Im Weiteren klassifiziert der Riley Score zwischen Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen in Remission und im Schub. Ein Riley Score von 0 bedeutet, dass keine Anzeichen einer Inflammation im vorliegenden Gewebe beobachtet werden konnten. Dagegen kennzeichnet ein Riley Score von 1 Patienten in Remission. Ab einem Riley Score von 2 handelt es sich um eine aktive Inflammation und somit Patienten im Schub. Hierbei identifiziert ein Riley Score von 2 eine schwache Inflammation, ein Riley Score von 3 eine moderate Inflammation und ein Riley Score von 4 eine starke Inflammation.

### **3.2.1.4 Aufarbeitung und Lagerung von humanem Material**

Plasma-, Urin- und Stuhlproben wurden lediglich von der CED-Patientenkohorte-Frankfurt (siehe Abschnitt 3.1.1.2) akquiriert. Intestinale Gewebeproben (siehe

Abschnitt 3.1.1.4) wurden lediglich von der CED-Patientenkohorte-Bayreuth und dem UCT Frankfurt akquiriert wurden.

#### **3.2.1.4.1 Plasma**

Blutproben von gesunden Probanden und Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wurden von ausgebildetem Fachpersonal im iCCC abgenommen und das Blut in NH<sub>4</sub>-Heparinröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) bis zum Transport in die Immunpharmakologie Frankfurt bei RT gelagert. In der Immunpharmakologie Frankfurt erfolgte die Zentrifugation des Blutes bei 750 x g und RT für 10 min. Danach wurde die obere Plasmaphase abgenommen und in Kryobehälter (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) überführt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Die anschließende Analyse wurde mittels ELISA (siehe Abschnitt 3.2.1.5) oder LC-MS/MS (siehe Abschnitt 3.2.1.6) durchgeführt.

#### **3.2.1.4.2 Urin**

Urinproben wurden zum gleichen Zeitpunkt wie die in Abschnitt 3.2.1.4.1 beschriebenen humanen Plasmaproben akquiriert. Die Abgabe, sowie eine kurze Zwischenlagerung des Urins erfolgte im iCCC bei RT in Urin-Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland). Nach Transport in die Immunpharmakologie Frankfurt wurden die Proben unmittelbar bei 750 x g für 10 min und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in Kryobehälter (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) überführt und der Urin bei -80°C gelagert. Die anschließende Analyse wurde mittels ELISA (siehe Abschnitt 3.2.1.5) durchgeführt.

#### **3.2.1.4.3 Stuhl**

Die Abgabe von Stuhlproben erfolgte in Eigenverantwortung der gesunden Probanden und Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. Es wurde versucht, die Probanden und Patienten auf ein Aufrechterhalten der Kühlkette hinzuweisen und die Stuhlproben in geeigneten Behältern (DaklaPack, Oberhausen, Deutschland) bei -20°C zu lagern. Zusätzlich wurde den Probanden und Patienten eine Kühltasche für den Transport ins iCCC ausgehändigt. Der Transport vom iCCC in die Immunpharmakologie Frankfurt erfolgte auf Trockeneis. In der Immunpharmakologie

Frankfurt wurden die Stuhlproben unmittelbar bei -80°C gelagert. Die anschließende Analyse wurde mittels ELISA (siehe Abschnitt 3.2.1.5) durchgeführt.

#### **3.2.1.4.4 Gewebe**

Intestinale FFPE Gewebeproben wurden aus dem Archiv der Pathologie Bayreuth und der Biobank des UCT Frankfurt akquiriert. Der Transport in die Immunpharmakologie, sowie die anschließende Lagerung erfolgte bei RT. Die Analyse der intestinalen Gewebeproben wird in den Abschnitten 3.2.1.7 bis 3.2.1.9 beschrieben.

#### **3.2.1.5 Konzentrationsbestimmung von Tryptophan und Kynurenin in Plasma-, Urin- und Stuhlproben mittels ELISA**

Humane Plasma-, Urin- und Stuhlproben wurden unverdünnt für die Analyse von Tryptophan und Kynurenin mittels ELISA verwendet. Die genaue Vorgehensweise ist dem Herstellerprotokoll (siehe Abschnitt 3.1.4.3) zu entnehmen.

#### **3.2.1.6 Konzentrationsbestimmung von Kynureninsäure, 3-Hydroxykynurenin, Anthranilsäure und 3-Hydroxyanthranilsäure in humanem Plasma mittels LC-MS/MS**

Alle LC-MS/MS Messungen von humanem Plasma und Zellkulturüberständen wurden in Mannheim (Prof. Dr. Weller, Hochschule Mannheim) durchgeführt.

#### **3.2.1.7 Immunhistochemische Analysen von intestinalen Gewebeproben**

Die immunhistochemischen (IHC)-Färbungen wurden mit FFPE intestinalen Gewebeproben durchgeführt. Zu jedem FFPE Block wurden 2 µm dicke sequenzielle Schnitte angefertigt. Ausnahmen der sequenziellen Anfertigung von Gewebeschnitten waren, wenn das Gewebe beim Schneiden gerissen war oder sich das Gewebe beim Kochen gelöst hat. Insgesamt konnte so sichergestellt werden, dass 95 % der Schnitte auf einer sequenziellen Analyse beruhten. Ein repräsentatives Beispiel ist in den *Supplements* unter dem Abschnitt 7.3.1 aufgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde pro Probanden/Patient und Lokalisation (Dünndarm/Dickdarm) eine Gewebeprobe untersucht. Es wurden also maximal zwei Gewebeproben (Dünndarm + Dickdarm) pro

Probanden/Patient und Zielstruktur analysiert. Nach dem Schneiden und Anhaften der Gewebeschnitte auf den Objektträgern erfolgte die Inkubation über Nacht im Thermoschrank bei 36 °C. Auf die Xylol-Deparaffinierung (2 x 5 min bei RT) und abgestufte Alkoholhydratationsschritte (jeweils 2 x für 5 min bei RT) folgte die zitratabhängige (pH 6) Proteinantigengewinnung für 30 min im Dampfgerar. Nach dreimaligem Waschen für 5 min bei RT in PBS (1x) wurden die endogenen Peroxidasen mit 0,3 % Wasserstoffperoxid und 0,1 % Natriumazid, verdünnt in PBS (1x), inaktiviert. Um einen möglichen störenden Einfluss von endogenem Avidin und Biotin zu verhindern, wurde das Avidin/Biotin-Blockierungskit verwendet. Hierfür wurde ein Tropfen des jeweiligen Reagenzes für 10 min bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 5 min bei RT in PBS (1x) erfolgte die Blockierung von unspezifischen Bindungen. Hierfür wurde mit Proteinblock oder 2% Ziegenserum (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), verdünnt in *Antibodydiluent*, für 30 min bei RT blockiert. Die Gewebeschnitte wurden anschließend über Nacht bei 4°C mit dem in *Antibodydiluent* verdünnten Primärantikörper inkubiert. In jedem Färbedurchgang wurde ein negativer Kontrollschnitt mitgeführt, in welchem lediglich der sekundäre Antikörper (Anti-Maus/Anti-Kaninchen) verwendet wurde (siehe *Supplements* Abschnitt 7.3.3). Alle primären Antikörper und die entsprechenden Verdünnungen sind in Tabelle 11 aufgeführt. Nach drei weiteren Waschzyklen für 5 min bei RT in PBS (1x) wurde ein Anti-Maus- oder Anti-Kaninchen-Meerrettichperoxidase-Detektionssystem mit anschließender Diaminobenzidin (DAB)-Chromogen-Färbung verwendet. Der Zweitantikörper wurde für 30 min bei RT inkubiert und im Anschluss etwa 50 µl des DAB-Reagenz auf die Gewebeschnitte gegeben. Das DAB-Reagenz wurde bis zur eindeutigen Braunfärbung auf dem Schnitt inkubiert, jedoch nicht länger als 5 min. Zudem wurde für jeden Erstantikörper innerhalb eines Färbevorganges exakt gleich inkubiert. Nach einem abschließenden Waschriff für 5 min bei RT in PBS (1x) wurde für 30 sek mit Meyers Hämatoxylin (PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland) gegengefärbt, 2 x 2 min in Leistungswasser gebläut und mit *Roti®-Mount Aqua* (CarlRoth, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckelt.

**Tabelle 11: Verdünnungen der Erstantikörper für IHC-Analysen**

Erstantikörper	Verdünnung
3-HAA	1:500
CD3	1:100
CD8	1:200
CD11b	1:200
CD11c	1:150
CD68	1:200
FoxP3	1:200
IDO1	1:1000
KMO	1:2000
KYNU	1:200
Kynurenin	1:100
MPO	1:200
TDO2	1:200

3-HAA = 3-Hydroxyanthranilsäure, FoxP3 = *Forkhead-Box-Protein P3*, IDO1 = Indolamin-2,3-Dioxygenase 1, IDO2 = Indolamin-2,3-Dioxygenase 2, KAT = Kynureninaminotransferase, KMO = Kynurenin-3-Monooxygenase, KYNU = Kynureninase, MPO = Myeloperoxidase, TDO2 = Tryptophan-2,3-Dioxygenase

### 3.2.1.8 Auswertung der immunhistochemischen Analysen von intestinalen Gewebeproben

Die Färbeergebnisse wurden mit einem inversen Mikroskop von Olympus (Olympus K. K., Tokio, Japan) dokumentiert. Die semi-quantitative Interpretation von positiven Bereichen/gefärbten Zellen wurde mit der *BZ Analyzer Software 9000* mit einem spezifischen für die IHC-basierten Algorithmus durchgeführt (Keyence, Osaka, Japan). Positive Färbungen wurden als klare (DAB-spezifische)-Braunfärbung definiert. Die Anzahl der positiven Zellen in jedem Abschnitt pro Gewebeschnitt wurden bestimmt und der Prozentsatz der positiven Fläche pro Gesamtfläche (für CD3, CD8, CD68, CD11b, CD11c, MPO, IDO, TDO, KYNU, Kyn und 3-HAA) oder der positiven Zellen pro Gesamtfläche (KMO und FOXP3) berechnet. Ein entsprechendes Beispiel ist in den *Supplements* unter dem Abschnitt 7.3.2 dargestellt. Die Quantifizierung wurde von

einer unabhängigen Person durchgeführt, der die Diagnose und die histopathologische Befundung nicht bekannt waren. Alle relevanten Zielstrukturen wurden für jeden FFPE Block untersucht und in die Statistik aufgenommen.

### 3.2.1.9 Immunfluoreszenz intestinaler Gewebeproben

Für die IF der intestinalen Gewebeproben wurde bis zur Inkubation des Erstantikörpers nach dem in Abschnitt 3.2.1.7 aufgeführten IHC-Färbeprotokoll vorgegangen. Die Antikörperverdünnung von IDO1 lag bei 1:1000 und von CD8 bei 1:200 in *Antibodydiluent*. Inkubiert wurde für 2 h bei RT. Anschließend erfolgten drei Waschrunde von jeweils 5 min bei RT in PBS (1x). Für die Detektion von IDO1 wurde der fluoreszenzbasierte Zweitantikörper anti-Kaninchen IgG Alexa-Fluor 488 (Verdünnung 1:200 in *Antibodydiluent*) und für die Detektion von CD8 der fluoreszenzbasierte Zweitantikörper anti-Maus IgG Alexa-Fluor 594 (Verdünnung 1:200 in *Antibodydiluent*) verwendet. Parallel zur Inkubation der fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper wurde in *Antibodydiluent* verdünntes 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI; 1:5000; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) auf das Gewebe gegeben. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT. Nach weiterem dreimaligem Waschen in PBS (1x) erfolgte das Eindeckeln mit *Fluoromount*<sup>TM</sup> (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und das Abdichten der Deckgläser mit Nagellack. Die Auswertung wurde direkt im Anschluss durchgeführt und erfolgte mit dem konfokalen Mikroskop LSM 510 Meta. Zum Ausschluss einer möglichen Autofluoreszenz des Gewebes, sowie einer unspezifischen Bindung des Zweitantikörpers wurden Gewebeschnitte ohne Antikörper als auch Gewebeschnitte, welche nur mit Zweitantikörper inkubiert wurden, bei jedem Färbedurchgang mitgeführt.

### **3.2.2 Murine ex vivo Versuche**

#### **3.2.2.1 Dextransulfat-Natrium-induzierte intestinale Entzündung bei C57BL/6 Mäusen**

8-9 Wochen alte weibliche C57BL/6 Mäuse wurden für sieben Tage in der Zentralen Forschungseinrichtung in Frankfurt gehalten und auf den anschließenden Versuchsbeginn vorbereitet. An Tag 1 des Versuchsbeginns erfolgte die Zugabe von Dextransulfat-Natrium (DSS) in das Trinkwasser der Mäuse. Insgesamt wurden drei Kohorten in den Versuch miteinbezogen. Die unbehandelte Kontrollkohorte erhielt über dem kompletten Zeitraume normales Trinkwasser. Für die DSS behandelten Kohorten wurde eine Gruppe mit 1,5% DSS versetztem Trinkwasser behandelt und eine Gruppe mit 2,5% versetztem Trinkwasser. Nach sechs Tagen wurden in beiden DSS Kohorten auf normales Trinkwasser umgestellt und die Mäuse für weitere drei Tage gehalten. An Tag 9 erfolgte die schmerzlose Tötung (humaner Endpunkt) der Tiere mittels translokaler Dislokation. Während des kompletten Versuchsablaufes wurden die Mäuse täglich begutachtet und ein Überwachungsprotokoll geführt. Dieses Überwachungsprotokoll, basierend auf dem *Canadian Council on Animal Care*, beinhaltet Kriterien wie die Abnahme des Körpergewichtes, sowie auffällige Veränderungen des körperlichen Zustandes. Als Anzeichen einer eingesetzten intestinalen Inflammation wurde neben einem Abfall des Körpergewichtes, eine veränderte Stuhlkonsistenz, sowie eine Reduktion der Kolonlänge untersucht.

#### **3.2.2.2 Aufarbeitung und Lagerung von murinem Plasma**

Blut der in Abschnitt 3.2.2.1 beschriebenen unbehandelten und behandelten C57BL/6 Mäuse wurde mittels des retrobulbären Plexus entnommen. Das frisch entnommene Blut wurde anschließend bei 750 x g für 10 min bei RT zentrifugiert, die Plasmafraktion in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und bei -80°C bis zu weiteren Analysen gelagert. Zudem wurde der gesamte GI-Trakt der Mäuse entnommen und die Länge des Dünn- und Dickdarms in cm bestimmt. Die LC-MS/MS Analysen (siehe Abschnitt 3.2.2.3) erfolgten in Olomouc (Dr. Henykova, *Czech Academy of Sciences*).



### 3.2.2.3 Konzentrationsbestimmungen von Kynurenin und 3-Hydroxy-anthranilsäure in murinem Plasma mittels LC-MS/MS

Die Analyse des murinen Plasmas erfolgte in Olomouc (Dr. Henykova, *Czech Academy of Sciences*). Die Proben wurden während des gesamten Vorbereitungsverfahrens vor Licht geschützt und gekühlt. 20 µl gekühltes murines Plasma wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) pipettiert. Danach erfolgte die Zugabe von 10 µl Methanol, welches die internen Standards enthielt. Die Probe wurde durch die Zugabe von 390 µl gekühltem Methanol (-20°C) deprotonisiert. Anschließend wurde für 1 min gevortext und 60 min bei -20 °C inkubiert, um eine vollständige Proteinausfällung zu gewährleisten. Danach wurden die Proben bei 6500 U/min für 7 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein Mikroschleuder-Zentrifugenfilterröhrchen mit einer 0,20 µm Nylonmembran (Grace Davison Discovery Sciences, Deerfield, USA) überführt. Diesem Schritt schloss sich ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 8000 U/min für 5 min und 4 °C an. Die filtrierte Probe wurde anschließend unter Stickstoff verdampft, in 30 µl zweiprozentigem Methanol gelöst, für 30 sek gevortext, für 5 min bei 4°C mit Ultraschall beschallt und in ein lichtgeschütztes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Ein Drittel des Probenvolumens (10 µL) wurde auf eine Umkehrphasen-Säule (ACQUITY UHPLC HSS T3 Column, 100Å, 1,8 µm, 2,1 mm x 100 mm; Waters Corporation, Milford, USA) injiziert, die mit der entsprechenden Vor-Säule (Waters Corporation, Milford, MA, USA) ausgestattet war. Die Analyten wurden mit einem 10-minütigen Gradienten von 0 - 2 min und mit einem Verhältnis von 98:2 eines Ameisensäure:Methanol-Gemisches (v/v) (isokratische Elution) eluiert, gefolgt von einer Elution mit einem Gradienten von 2 - 10 min eines 40:60 Ameisensäure:Methanol-Gemisches (v/v) (Gradientenelution). Die Flussrate betrug 0,3 ml/min bei einer Säulentemperatur von 30 °C. Am Ende des Gradienten wurde die Säule für 1 min mit 100% Methanol gewaschen und für weitere 3 min unter den Startkonditionen äquilibriert. Um ein Verstopfen der Elektrosprayquelle zu vermeiden, wurde der Ausfluss für die ersten 2 - 3 min der Gradientenelution in den Abfall geleitet. Die Analysen wurden unter den folgenden optimierten Parametern durchgeführt: Kapillarspannung 0,5 kV; Temperatur des Quell-/Desolvationsgases 120/550 °C; Konus-/Desolvationsgas-(Stickstoff-) Durchflussraten 2,0/550 l/h. Als Kollisionsgas wurde Argon mit einem optimierten Druck von 5,10<sup>-3</sup> mbar verwendet. Die Kollisionsenergien für spezifische Quantifizierungs- und Bestätigungsübergänge

wurden optimiert, um die Empfindlichkeit zu maximieren. Die Analyten wurden auf der Grundlage ihrer Retentionszeiten (4,84 min für Kynurenin und 5,78 min für 3-HAA) in mehrere *Multiple-Reaction-Monitoring* (MRM)-Scan-Segmente aufgeteilt. Die Quantifizierungs- (Q) und Konformationsionen (K) der Zielverbindungen wurden als 209 > 94 (Q) und 209 > 192 (C) für Kynurenin, 216 > 198 für [ $^2\text{H}_6$ ]-Kynurenin, 154 > 136 (Q) und 154 > 108 (C) für 3-HAA sowie 157 > 139 für [ $^2\text{H}_3$ ]-3-HAA identifiziert. Die Konzentrationen der endogenen Verbindungen in den Proben wurden mit Hilfe von Kalibrierkurven und durch Vergleich der Peakflächen der unmarkierten endogenen Verbindungen in den MRM-Chromatogrammen mit denen der entsprechenden isotope-markierten internen Standards bestimmt.

Alle Analysen wurden mit einem Acquity UPLC® System (Waters Corporation, Milford, MA, USA) durchgeführt, welches an ein Xevo® TQ Tandem-Quadrupol-Massenspektrometer (Waters Corporation, Milford, MA, USA) angeschlossen war.

### 3.2.3 Humane *in vitro* Versuche

#### 3.2.3.1 Isolation und Kultivierung von Peripheren-Mononukleären-Blutzellen

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Plastikmaterial, soweit nicht steril vom Hersteller bezogen, wurde 30 min bei einem Überdruck von 1 bar und einer Temperatur von 121 °C autoklaviert. Unsterile Lösungen wurden steril filtriert (0,2 µm Filter) oder mit Hilfe des Autoklaven sterilisiert. 12 ml Blut wurde vorsichtig mit 20 ml PBS verdünnt. 12 ml *Histopaque* wurde in ein 50 ml *Falcontube* vorgelegt und mit dem Gesamtvolumen des verdünnten Blutes überschichtet ohne die Oberflächenebene zu zerstören. Die Dichtegradientenzentrifugation wurde bei 750 x g für 35 min bei RT ohne Bremsen durchgeführt. Die Plasmaphase (obere Phase) wurde vorsichtig entfernt, um die Schicht mononukleärer Zellen (mittlere Phase) sammeln zu können. Eine Aspiration von *Histopaque* (untere Phase) wurde vermieden. Nach Übertragung der PBMCs in ein neues 50 ml *Falcontube* wurden die Zellen mindestens zweimal bei 400 x g für 10 min mit PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschen wurden die Zellen in 20 ml PBS resuspendiert, um die Zellzahl (siehe Abschnitt 3.2.3.7) zu bestimmen. PBMCs wurden entweder in einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in einer T75-Zellkulturflasche bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Gehalt (Standardbedingungen) in

Vollmedium (siehe Abschnitt 3.1.4.5) kultiviert oder direkt zur Isolierung/Generierung weiterer Immunzellsubpopulationen verwendet.

### **3.2.3.2 Isolation von Monozyten, B Zellen, CD3+ T Zellen und CD8+ T Zellen**

Monozyten, B Zellen, sowie CD3+ T Zellen und CD8+ T-Zellen wurden aus frisch isolierten PBMC (siehe Abschnitt 3.2.3.1) mittels der *EasySep™ Human negative* Isolierungskits, welche in Abschnitt 3.1.4.3 aufgeführt, sind isoliert. Zusammengefasst wurden PBMC in *EasySep™*-Isolationspuffer resuspendiert, in ein Polystyrolröhrchen (12 x 75 mm) überführt und mit dem im Kit enthaltenen Antikörper-Isolationscocktail inkubiert, welcher an alle nicht relevanten Zellpopulationen bindet. Im nächsten Schritt wurden magnetische *Beads* hinzugegeben, welche an die Antikörper binden und das Röhrchen für 10 min in einen *EasySep™* Magneten (Stemcell Technologies, Köln, Deutschland) gestellt. Die ungebundenen Zielzellen wurden durch Umkehrung des Magneten und Übertragung in ein neues Sammelröhrchen überführt. Das Verfahren wurde wiederholt, um einen hohen Reinheitsgrad zu gewährleisten. Die Reinheit wurde mittels FACS bestimmt und betrug im Durchschnitt mindestens 90%. Anschließend wurde die Zellzahl eingestellt (siehe Abschnitt 3.2.3.7) und die Zellen in entsprechendem Vollmedium (siehe Abschnitt 3.1.4.5) unter Standardbedingungen kultiviert.

### **3.2.3.3 Generierung humaner Makrophagen**

Nach Isolation der PBMCs aus *Buffy Coats* (siehe Abschnitt 3.2.3.1) wurden die Zellen in Vollmedium (siehe Abschnitt 3.1.4.5) resuspendiert und für 90 min unter Standardbedingungen in 6-Well Platten haften gelassen. Im nächsten Schritt wurden nicht adhärierende Zellen mittels eines vorsichtigen Mediumwechsels entfernt. Die adhärierenden Monozyten wurden in einem Volumen von 2 ml Vollmedium pro Well unter Standardbedingungen kultiviert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Nach sechs Tagen Kultur erwarben die Monozyten einen Makrophagen-ähnlichen Phänotyp und wurden für die Experimente verwendet. Um eine Polarisierung in M1 und M2 Makrophagen einzuleiten wurden die Zellen für weitere 24 Std. mit einem

Gemisch aus 100 U/ml IFN $\gamma$  und 100 ng/ml LPS (M1 Phänotyp), oder für weitere 72 Std. mit 20 ng/ml IL-4 kultiviert.

#### **3.2.3.4 Generierung humaner Dendritischer Zellen**

Nach Isolation der PBMCs aus *Buffy Coats* (siehe Abschnitt 3.2.3.1) wurden die Zellen in Vollmedium (siehe Abschnitt 2.1.4.5) resuspendiert und für 90 min unter Standardbedingungen in 6-Well Platten haften gelassen. Im nächsten Schritt wurden nicht adhärierende Zellen mittels eines vorsichtigen Mediumwechsels entfernt. Die adhärierenden Monozyten wurden in einem Volumen von 2 ml Vollmedium mit 800 U/ml GM-CSF und 500 U/ml IL-4 pro Well unter Standardbedingungen kultiviert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Nach sieben Tagen Kultur erwarben die Monozyten einen DC-ähnlichen Phänotyp und wurden für die Experimente verwendet.

#### **3.2.3.5 Kultivierung der intestinalen Zelllinien CCD 841 CoN, CaCo-2 und DLD-1**

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Plastikmaterial, soweit nicht steril vom Hersteller bezogen, wurde 30 min bei einem Überdruck von 1 bar und einer Temperatur von 121 °C autoklaviert. Unsterile Lösungen wurden steril filtriert (0,2  $\mu$ m Filter) oder mit Hilfe des Autoklaven sterilisiert. CCD 841 CoN und CaCo-2 Zellen wurden in MEM Medium mit 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS) und 5% Penicillin/Streptomycin kultiviert. DLD-1 Zellen wurden in DMEM Medium mit 10% hitzeinaktiviertem FCS und 5% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die Temperatur im Brutschrank betrug 37 °C und der CO<sub>2</sub>-Gehalt lag bei 5% (Standardbedingungen). Mit allen Zusätzen versehenes Medium wird im Folgenden als Vollmedium (siehe Abschnitt 3.1.4.5) bezeichnet.

#### **3.2.3.6 Auftauen, Passagieren und Wegfrieren der intestinalen Zelllinien CCD 841 CoN, CaCo-2 und DLD-1**

Zum Auftauen der Zellen wurde das jeweilige Vollmedium (siehe Abschnitt 3.1.4.5) im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Sobald die Zellen pipettierbar waren wurden sie in

10 ml des vorgewärmten Vollmediums überführt. Nach einer Zentrifugation von 5 min (400 x g, RT) wurde der Überstand abgenommen. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 8 ml neuem Vollmedium suspendiert und in einer T25 Zellkulturflasche ausgesät, in der sie unter Standardbedingung kultiviert wurden. Zwei Tage nach dem Auftauen wurden die Zellen aus der T25 Zellkulturflasche in eine T75 Zellkulturflasche überführt und unter Standardbedingungen weiter kultiviert. Nach siebentägiger Kultur wurde mit den Versuchen begonnen werden.

In regelmäßigen Abständen und bei einer Konfluenz von etwa 70 % wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das jeweilige Vollmedium abgenommen, die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und anschließenden 5 ml Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 3-7 min unter Standardbedingungen im Brutschrank wurden die Zellen in 8 ml neuem Vollmedium aufgenommen und im Verhältnis 1:4 bzw. 1:6 in neuen Zellkulturflaschen ausgesät und unter Standardbedingungen kultiviert. In regelmäßigen Abständen wurden die Zellen auf eine potentielle Mykoplasmen-Kontamination überprüft. Hierfür wurde das *VenorGeM Classic Kit* (Minerva Biolabs, Berlin, Deutschland) verwendet.

Zum Wegfrieren der Zellen, sowie zur Langzeitlagerung wurden die Zellen nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 70% mit 10 ml PBS gewaschen und mit 5 ml Trypsin/EDTA gelöst. Die Zellen wurden in 10 ml Vollmedium aufgenommen und für 5 min zentrifugiert (400 x g, RT). Der Überstand wurde abgenommen. Anschließend wurde das Einfriermedium vorbereitet. Hierfür wurde eine Lösung aus 90% FCS und 10% Dimethylsulfoxid vorbereitet und auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden suspendiert und jeweils 1 ml Zellsuspension in Kryotubes überführt. Pro T75 Zellkulturflasche wurden vier Kryotubes weggefroren. Nach 24 Std. Zwischenlagerung bei -80°C (*MrFrosyt*<sup>TM</sup>, ThermoFisher, Waltham, USA) wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

### **3.2.3.7 Zellzahlbestimmung der primären Immunzellen und intestinalen Zelllinien**

Nach Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes wurden die jeweiligen Zellpellets in neuem Vollmedium aufgenommen, 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau gemischt, auf eine Neubauerzählkammer gegeben und gezählt. Alle vier

Zählquadranten wurden ausgezählt und die Zellzahl berechnet, indem der Mittelwert der vier ausgezählten Zählquadrate gebildet und mit dem Kammerfaktor  $10^4$  multipliziert. Zusätzlich wurde mit dem Faktor 2 aus der Trypanblau entstandenen Verdünnung multipliziert. Die berechnete Zellzahl pro ml konnte nun auf die gewünschte Zellzahl eingestellt werden. Folgende Gleichung wurde hierfür verwendet

$$\frac{\text{Zellzahl aller vier Zählquadrate}}{4} \times 2 = \text{Zellen/ml}$$

Im Anschluss konnte die Menge in ml für eine bestimmte Zellzahl berechnet werden:

$$\frac{\text{gewünschte Zellzahl}}{\text{ Zelldichte } \left( \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right)} = \text{ml}$$

### 3.2.3.8 Stimulation der primären Immunzellen und intestinalen Zelllinien

$1 \times 10^6$  der jeweiligen primären Immunzellen sowie  $5 \times 10^5$  CCD 841 CoN, CaCo-2 oder DLD-1 Zellen, wurden in 2 ml des entsprechenden Vollmediums (siehe Abschnitt 3.1.4.5) in 6-Well Platten ausgesät. Am nächsten Morgen wurden die Zellen mit PBS gewaschen, sowie auf FCS/AB-Serum freies Medium umgestellt. Nach vierstündiger Kultivierung unter Startbedingungen erfolgte die Stimulation. Hierfür wurden die Zellen in 2 ml FCS/AB-Serum freiem Medium mit einem Gemisch aus 100 U/ml  $\text{IFN}\gamma$ , 100 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  und 10 ng/ml  $\text{IL-1}\beta$  stimuliert. Nach weiteren 24 Std. Kultivierung unter Standardbedingungen erfolgte die Ernte der Zellen sowie die Isolation der RNA (siehe Abschnitt 3.2.3.9).

### 3.2.3.9 RNA Isolation

Gesamt-RNA wurde mit dem *peqGold Total RNA Kit* aus primären Immunzellen, sowie intestinalen Epithelzellen isoliert. Primäre Immunzellen wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS für die Isolation der RNA eingesetzt. Die intestinalen Epithelzellen wurden zuvor mit Trypsin/EDTA gelöst, zwei Mal mit PBS gewaschen und das Zellpellet zur Isolation der RNA verwendet. Die RNA-Extraktion wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Isolierung basiert auf einer reversiblen Bindung der RNA an Silika-Säulen und Elution in 10-35  $\mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser. Zur Eliminierung von Chromatin-, doppel- und einzelsträngige DNA wurde die isolierte RNA mit DNase behandelt.

### 3.2.3.10 Reverse Transkription der RNA und Generierung von komplementärer DNA

Die Konzentrationen der isolierten RNA wurden mit einem Spektrophotometer bestimmt. Für jede Probe wurden gleiche Mengen RNA (200 - 500 ng) in komplementäre DNA transkribiert. Hierfür wurde das *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* verwendet. Das Reaktionsgemisch ist in Tabelle 12 aufgeführt.

**Tabelle 12: Reaktionsgemisch zur Herstellung von komplementärer DNA aus RNA**

Komponente	Volumen pro Probe [µl]
<i>Aqua dest</i>	4,2
10x Reverse Transkriptase Puffer	2
Random Primers	2
dNTPs, 10 mM	0,8
Reverse Transkriptase	1
RNA	200 - 500 ng
<i>Aqua dest</i>	auf 20 µl auffüllen

Die Reverse Transkription wurde mit dem in Tabelle 13 aufgeführten Programm durchgeführt.

**Tabelle 13: Programm der Reversen Transkription zur Synthese von komplementärer DNA**

Vorgang	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1	25	10
2	37	120
3	85	5
4	4	auf Warteschleife

### 3.2.3.11 Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion

Um die mRNA-Expression verschiedener Zielgene zu quantifizieren, wurden spezifische 5'Carboxyfluorescein (FAM)-markierte Sonden verwendet. Für jede Probe wurde eine quantitative Real-Time-PCR (qRTPCR) in Duplikaten in 96-Well-Platten (Biozym Scientific, Wien, Österreich) durchgeführt. Die Reaktion wurde mit 1 µl komplementärer DNA (cDNA) und 9 µl Reaktionsgemisch durchgeführt. Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches ist in Tabelle 14 aufgeführt. Für den Nachweis wurde ein 7500 *Fast Realtime* PCR-System unter Anwendung eines definierten Programms, welches in Tabelle 15 gezeigt ist, verwendet.

**Tabelle 14: Reaktionsgemisch für die Anwendung der qRTPCR**

Komponente	Volumen pro Probe [µl]
<i>Aqua dest</i>	3,5
Precision Fast Mastermix	5
Taqman Sonde	0,5
cDNA	1

**Tabelle 15: qRTPCR Programm**

Vorgang	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
1	94	2	1
2	94	1	
3	60	1	27-33
4	72	1	
5	72	10	1
6	4	auf Warteschleife	1

Die Ergebnisse wurden mit der  $\Delta C_t$ -Methode ausgewertet. Die Expressionsniveaus der Zielgene wurden mit den Expressionsniveaus der nicht regulierten Haushaltgene GAPDH und RPL13A verglichen. Für die Genexpressionsanalysen von M1 und M2 Makrophagen wurden die Haushaltsgene GAPDH und ACTB verwendet. Die relative Genexpression wurde wie im Folgenden angegeben berechnet:

$$\text{Relative Genexpression} = 2^{-\Delta C_t}$$



### 3.2.3.12 Analyse von Zelloberflächenmarkern und der intrazellulären IDO1 Expression in PBMCs und CD8+ T Zellen mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting* = FACS) wurde verwendet, um eine IDO1 Proteinexpression in T Zellen nachzuweisen. Idealerweise fließen in der Durchflusszytometrie einzelne Zellen durch eine mit Laserstrahlen beschossene Kapillare, sodass Informationen über die Größe (FSC, Vorwärtsstreuung) und Granularität (SSC, seitliche Streuung) der zu untersuchenden Zielzelle ermittelt werden. Veränderungen in den Proteinexpressionen von intrazellulären oder Zelloberflächenmarkern werden mit spezifischen Antikörpern analysiert, die mit einem Fluorochromen gelabelt sind. Die Fluorochrome werden durch spezifische Laserstrahlen angeregt und das emittierte Licht detektiert. Für die durchflusszytometrische Analyse der IDO1 Proteinexpression wurden die Zellen zunächst in FACS-Puffer gewaschen. Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden, wurden alle Zellen für 15 min bei RT mit FC-Block (Verdünnung 1:200 in FACS-Puffer) inkubiert. Zum Nachweis der Zelloberflächenmarker erfolgte eine Inkubation mit den Antikörpern gegen CD3, CD4 und CD8 in 100 µl FACS-Puffer (Verdünnung 1:100) für 30 min bei 4°C im Dunkeln. Die Zellen wurden daraufhin zwei Mal gewaschen und für die intrazelluläre IDO1 Färbung vorbereitet. Die intrazelluläre Färbung wurde gemäß den Empfehlungen des Herstellers für das *FoxP3 Staining Buffer Set* (siehe Abschnitt 2.1.4.3) durchgeführt. Die Zelloberflächenfärbung wurde fixiert und die Zellen permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem spezifischen ungelabelten Antikörper gegen IDO1 (Verdünnung 1:300) für 30 min. bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem sekundären, Fluorochrom BV510 konjugierten Antikörper für weitere 30 min im Dunkeln bei 4°C. Bis zur Messung wurden die Zellen in FACS-Fixierungspuffer bei 4°C gelagert.

Für den Nachweis einer induzierten IDO1 Proteinexpression wurden  $1 \times 10^6$  frisch isolierte PBMCs (siehe Abschnitt 3.2.3.1) oder CD8+ T Zellen (siehe Abschnitt 3.2.3.2) isoliert und über Nacht in 2 ml Vollmedium unter Standardbedingungen kultiviert. Am darauffolgenden Tag erfolgte das Umstellen auf serumfreies Medium. Nach weiteren vier Stunden Kultivierung wurden die Zellen stimuliert. Hierfür wurden die Zellen mit einem Gemisch aus dem CD2/CD3/CD28 T Zell Aktivator (5 µl/ml) und IL-2 (1 µg/ml), einem Gemisch aus Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA, 20 nM) und Ionomycin

(1  $\mu$ M), einem Gemisch aus dem CD2/CD3/CD28 T Zell Aktivator (5  $\mu$ l/ml), IFN $\gamma$  (100 U/ml), TNF $\alpha$  (100 ng/ml) und IL-1 $\beta$  (10ng/ml) oder LPS (1  $\mu$ g/ml) behandelt. Die Zellen wurden für 24 Std., 48 Std. oder 72 Std. unter Standardbedingungen kultiviert. Als Positivkontrolle wurden PBMCs verwendet, welche mit IFN $\gamma$  (100 U/ml), TNF $\alpha$  (100 ng/ml) und IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) stimuliert wurde. Hierbei sollte die IDO1 Proteinexpression in APCs induziert werden.

### 3.2.4 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwert +/- Standardabweichung (SD) dargestellt. Die Daten wurden auf Normalverteilung, sowie signifikante Ausreißer geprüft und falls vorhanden, signifikante Ausreißer von der Gesamtstatistik entfernt. Zur Ermittlung von signifikanten Ausreißern wurde der Grubbs' Test verwendet. Geeignete statistische Test für Mehrfachvergleiche waren der Mann-Whitney-Test, sowie der paired-students t-test. Für Korrelationsanalysen wurde der Pearson's Korrelationskoeffizient gebildet. Signifikanzen sind mit \*/# für  $p < 0,05$ , mit \*\*/## für  $p < 0,01$ , mit \*\*\*/### für  $p < 0,001$  und mit \*\*\*\*/#### für  $p < 0,0001$  angegeben. Sternchen (\*) zeigen Vergleichen wie angeben, *Hashtags* (#) zeigen Vergleiche zur Kontrolle.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Untersuchung der CED-Patientenkohorte-Frankfurt

#### 4.1.1 Charakterisierung der CED-Patientenkohorte-Frankfurt zur systemischen Analyse des Tryptophanstoffwechsels

Zur Charakterisierung des systemischen Tryptophan (TRP)-stoffwechsels im Krankheitsbild der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) wurde Patientenmaterial von Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) Patienten, sowie von gesunden Probanden (Ktrl) akquiriert. Für die eindeutige Zuordnung in Teil 1 der vorliegenden Arbeit wird diese Gesamtkohorte im Folgenden als CED-Patientenkohorte-Frankfurt bezeichnet. Die Untersuchung der CED-Patientenkohorte-Frankfurt beschäftigt sich hierbei mit der systemischen Analyse von TRP-Metaboliten mittels LC-MS/MS Analysen im Blutplasma der Patienten bzw. Probanden. Neben dieser Kohorte, wird im zweiten Teil dieser Arbeit anhand einer weiteren CED-Patientenkohorte (CED-Patientenkohorte-Bayreuth) der lokale und mittels immunhistochemischen (IHC)-Färbungen analysierte TRP-Stoffwechsel in Gewebeproben gezeigt. In den Abschnitten 3.2.1.1 und 3.2.1.2 des Material und Methoden Teils sind die genauen Charakterisierungen der Patientenkohorten dargestellt. Die systemische Analyse des TRP-Stoffwechsels beinhaltet die TRP und TRP-Metabolitanalysen im Blutplasma der in Tabelle 16 aufgeführten Probanden und CED Patienten, welche in Abschnitt 4.1.2 vorgestellt wird. Innerhalb der MC Kohorte sind zur Einordnung der inflammationsbedingten Aktivität zwei der üblichen Scores dargestellt, und zwar der *Harvey-Bradshaw Index* (HBI, Remission 1-6, aktive Inflammation ab 7) von 5,8 +/- und der *Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity* (CDEIS, Remission ab 4-6, aktive Inflammation ab 7) von 6,0 +/- . In der CU Kohorte lag der CU spezifische *Mayo Score* (Remission 1-2, aktive Entzündung ab 3) durchschnittlich bei 1,1 +/- . Somit handelte es sich bei der CED-Patientenkohorte-Frankfurt um Patienten in Remission. Weiter zeigt Tabelle 16 anhand der Montreal-Klassifizierung, welche Regionen des Gastrointestinalen (GI)-Traktes von einer entzündungsbedingten Pathologie betroffen waren. Sieben Patienten der MC Kohorte wiesen eine Veränderung des Ileums (L1), vier Patienten eine Veränderung des Kolons (2), und ein Patient eine Veränderung sowohl des Ileums als auch des Kolons

(L3) auf. In der CU Kohorte zeigten zwei Patienten eine Proktitis (E1), sechs Patienten eine Linksseitenkolitis (E2) und wiederum zwei Patienten eine Pankolitis (E3).

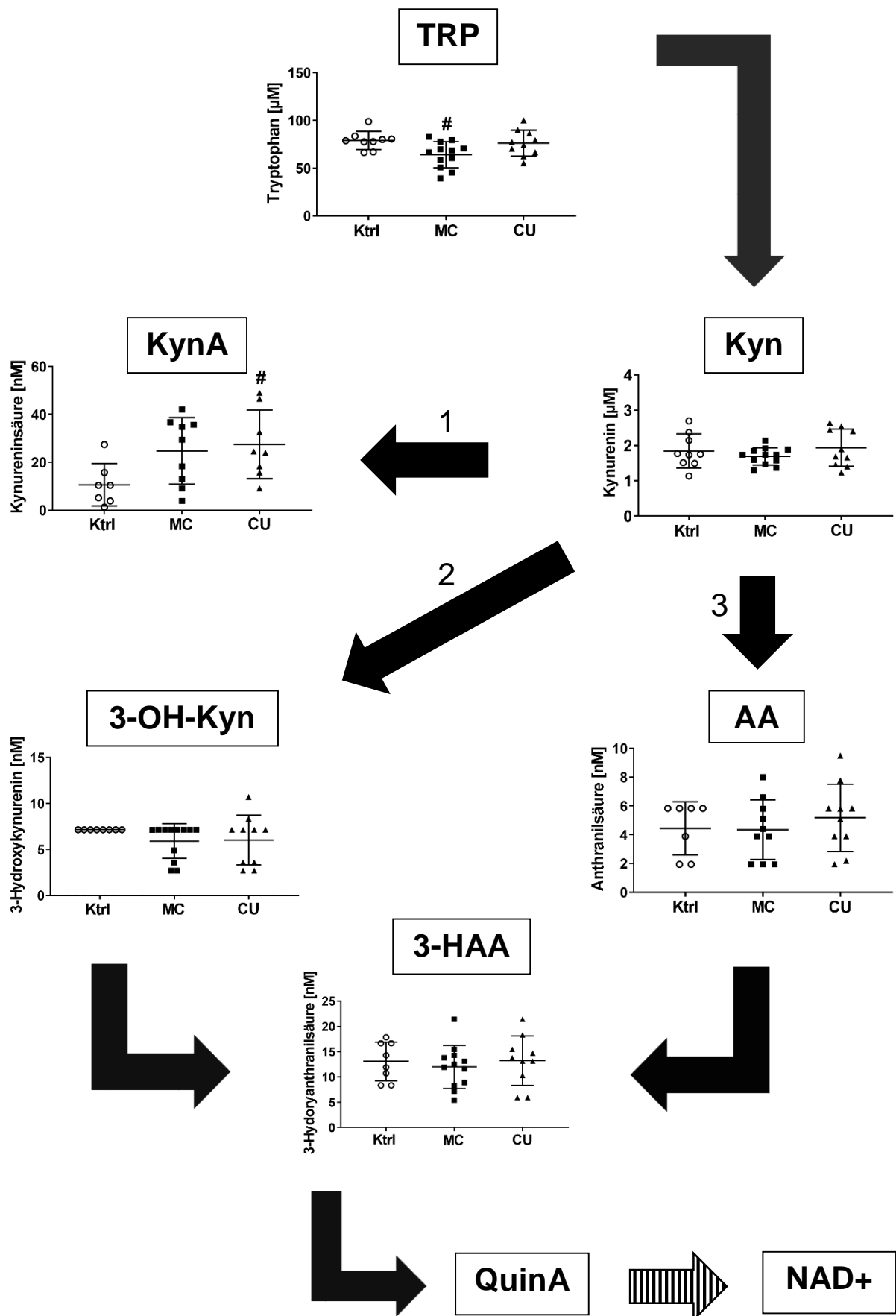
**Tabelle 16: Klinische Charakteristika der CED-Patientenkohorte-Frankfurt.** Patienten mit gesicherter Diagnose Morbus Crohn (MC) oder Colitis ulcerosa (CU), sowie gesunde Probanden (Ktrl) wurden eingeschlossen und Plasmaproben gesammelt. Es erfolgte eine vergleichende Analyse von Ktrl zu MC und CU, sowie zwischen MC und CU. Die Erstellung der klinischen Scores und die Klassifizierung nach Montreal sind von einem erfahrenen Gastroenterologen durchgeführt worden.

	<b>Kontrolle (Ktrl)</b>	<b>Morbus Crohn (MC)</b>	<b>Colitis ulcerosa (CU)</b>
<b>n</b>	9	12	10
<b>Geschlecht (m/w)</b>	5/4	5/7	5/5
<b>Klinische Scores</b>			
HBI (Durchschnitt)	-	5	-
CDEIS (Durchschnitt, Bereich)	-	3.5 (3 - 7)	-
Mayo (Durchschnitt, Bereich)	-	-	1.1 (0 - 2)
<b>Montreal Klassifizierung (Anzahl Patienten)</b>			
<b>Morbus Crohn (MC)</b>			
L1 (Ileum)	-	7	-
L2 (Kolon)	-	4	-
L3 (Ileokolon)	-	1	-
L4 (Oberer GI Trakt)	-	-	-
<b>Colitis ulcerosa (CU)</b>			
E1 (Proktitis)	-	-	2
E2 (Linksseitenkolitis)	-	-	6
E3 (Pankolitis)	-	-	2

CDEIS = Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity, CU = Colitis Ulcerosa, GI = Gastrointestinal, HBI = Harvey-Bradshaw-Index, Ktrl = Kontrolle, MC = Morbus Crohn

#### **4.1.2 Analyse des systemischen Tryptophanstoffwechsels der CED-Patientenkohorte-Frankfurt**

Mittels ELISA, sowie LC-MS/MS sollte innerhalb der CED-Patientenkohorte-Frankfurt eine krankheitsbedingte Veränderung von TRP und TRP-Metabolitkonzentrationen im Blutplasma untersucht werden. Ziel war es potenzielle Biomarker zu identifizieren, welche eine klare Differenzierung zwischen MC und CU ermöglichen. In Abbildung 5 sind die Messungen der Metabolitkonzentrationen des gesamten TRP-Stoffwechselweges zwischen gesunden Probanden (Ktrl), sowie MC und CU Patienten in Remission gezeigt. Insgesamt waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Auch eine Subklassifizierung anhand der Montreal Klassifizierung in Unterkategorien zeigte keine Unterschiede, sowohl innerhalb der MC Kohorte (L1 vs. L2), als auch nicht zwischen den jeweiligen Unterkategorien (L1 vs. E2 / L2 vs. E2). Beim Vergleich der MC und CU Kohorten mit der Kontrollkohorte, fiel jedoch auf, dass die TRP-Konzentrationen bei MC Patienten geringer waren. Dieser Effekt war innerhalb der CU Kohorte nicht zu beobachten. Trotz der verminderten TRP-Konzentration innerhalb der MC Kohorte, zeigte weder die MC Kohorte noch die CU Kohorte signifikante Konzentrationsunterschiede von Kynurenin, vergleichend zur Kontrollkohorte. Die Konzentrationsbestimmungen von Kynureninsäure (KynA) wiesen dagegen ein erhöhtes Niveau innerhalb der CU Kohorte auf, das wiederum nicht in der MC Kohorte nachzuweisen war. Konzentrationsanalysen von 3-Hydroxykynurenin (3-OH-Kyn), Anthranilsäure (AA) und 3-Hydroxyanthranilsäure (3-HAA) zeigten keine Veränderungen. Zusammenfassend verdeutlichen die hier dargestellten Daten, dass sich Messungen von TRP und TRP-Metaboliten im Blutplasma nicht als Biomarker zur Differenzierung von MC und CU Patienten in Remission eignen. Trotzdem verdeutlichten die Ergebnisse, dass es krankheitsbedingte Veränderungen in den TRP und KynA Konzentrationen zwischen CED-Patienten und gesunden Probanden gab. Offen bleibt die Frage, ob eine aktive Inflammation vor Therapie oder im *Relapse* Einfluss auf ein verändertes Profil des TRP-Stoffwechsels bei CED-Patienten hat und somit als Biomarker zur Differenzierung von MC und CU genutzt werden kann.



**Abbildung 5: Analyse von TRP und TRP-Metaboliten in Blutplasmaproben von CED-Patienten in Remission.** Die vergleichende Analyse von TRP und TRP-Metaboliten erfolgte zwischen CED-Patienten (Morbus Crohn und Colitis ulcerosa) in Remission und gesunden Kontrollen. Die Analyse fand mittels ELISA und LC-MS/MS aus abzentrifugierten Plasmaproben statt. In der ersten enzymatischen Spaltung wird TRP zu Kyn metabolisiert. Kyn, als zentraler Metabolit, kann drei unterschiedliche Stoffwechselwege durchlaufen. Als Abbauprodukte von Kyn entstehen KynA (1), 3-OH-Kyn (2), sowie AA (3). 3-OH-Kyn und AA werden über 3-HAA zu QuinA verstoffwechselt. QuinA dient als Substrat zur finalen Produktion von NAD<sup>+</sup>. Graphen dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD von n = 8 - 13 der jeweiligen Patientenkohorten und Kontrollen. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test. # = verglichen zur gesunden Kontrolle, # < 0,05; \* = verglichen zwischen MC und UC, \* < 0,05; 3-HAA = 3-Hydroxyanthranilsäure, 3-OH-Kyn = 3-Hydroxyanthranilsäure, AA = Anthranilsäure, CU = Colitis ulcerosa, CED = Chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Ktrl = Kontrolle, Kyn = Kynurenin, KynA = Kynurensäure, MC = Morbus Crohn, NAD<sup>+</sup> = Nicotinadenindinukleotid, QuinA = Quinolinsäure, TRP = Tryptophan

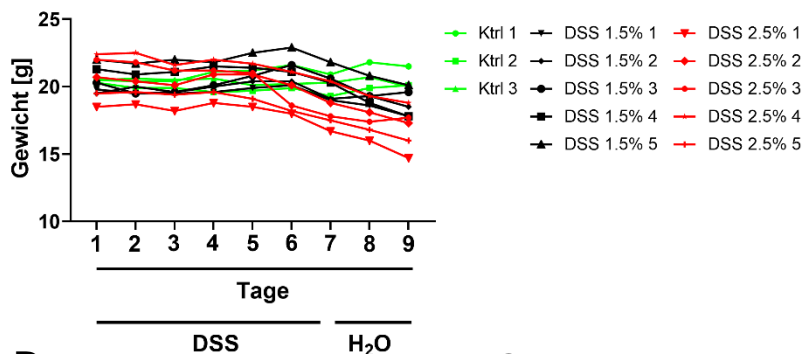
## 4.2 Untersuchung von Tryptophanmetaboliten im murinen Modell der Dextran-sulfat-Natrium induzierten intestinalen Inflammation

### 4.2.1 Krankheitsverlauf

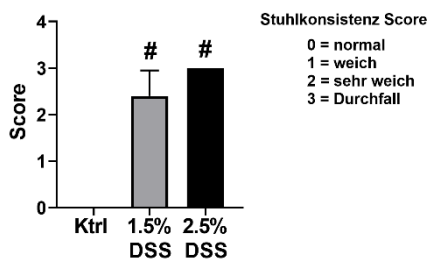
Um den Einfluss einer aktiven intestinalen Inflammation auf die Veränderung des systemischen TRP-Stoffwechsels im Blutplasma zu untersuchen, sollten C57BL/6 Mäuse mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen Dextran-sulfat-Natrium (DSS) im Trinkwasser behandelt werden. Abbildung 6 zeigt die entzündungsinduzierten, pathophysiologischen Veränderungen der C57BL/6 Mäuse. Hierbei verdeutlicht Abbildung 6A, dass mit DSS versetztes Trinkwasser sowohl innerhalb der 1,5% DSS Kohorte als auch in der 2,5% DSS Kohorte Gewichtsverluste induzierte. Dabei wiesen die mit 2,5% DSS behandelten C57BL/6 Mäuse größere Gewichtsverluste als die mit 1,5% behandelten C57BL/6 Mäuse auf. Dass es zu einer pathophysiologischen Veränderung der DSS behandelten Mäuse gekommen war, verdeutlichte auch die Veränderung der Stuhlkonsistenz (Abbildung 6B) sowie die Verminderung der Kolonlänge (Abbildung 6C). Auffallend war, dass die mit 2,5% behandelten C57BL/6 Mäuse signifikant reduzierte Kolonlängen aufwiesen im Vergleich zu den mit 1,5 % DSS behandelten Mäusen. Keine der beiden Konzentrationen der DSS Behandlung zeigte dagegen einen Effekt auf die Länge des Dünndarms von C57BL/6 Mäusen (Abbildung 6D). Der Versuch verdeutlichte wie erwartet, dass die zwei

unterschiedlichen Konzentrationen von mit Trinkwasser versetztem DSS Einfluss auf die Darmphysiologie der C57BL/6 Mäuse hatte, indem es eine überwiegend im Kolon lokalisierte Inflammation des Darms induzierte. Die Behandlung mit 2,5 % DSS war dabei signifikant effektiver im Vergleich zu 1,5% DSS. Innerhalb dieser Arbeit war also die Frage, ob sich im Blutplasma der unbehandelten und behandelten C57BL/6 Mäuse unterschiedliche Auswirkungen auf systemische TRP-Stoffwechselprodukte zeigten.

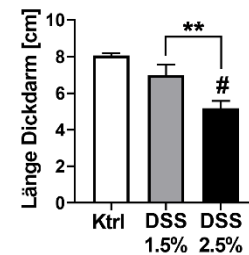
A



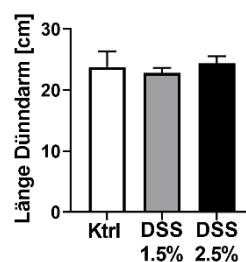
B



C



D



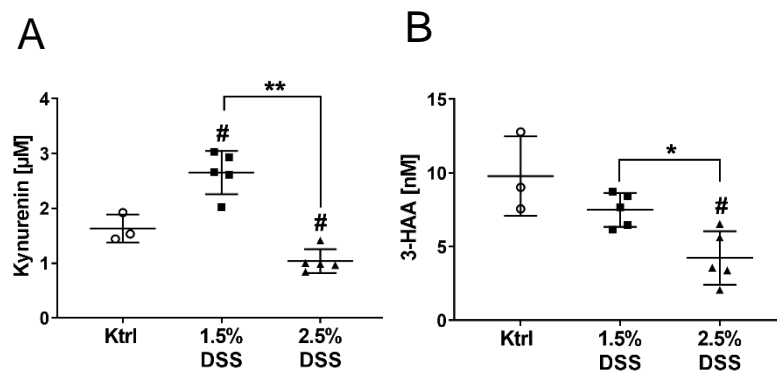


**Abbildung 6: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen DSS auf Gewicht, Stuhlkonsistenz und Länge der Darmabschnitte von C57BL/6 Mäusen.** Das Trinkwasser von C57BL/6 Mäusen wurde 6 Tage mit zwei (1,5% oder 2,5 %) unterschiedlichen Konzentrationen DSS versetzt. Die Gabe erfolgte ad libitum. An Tag 6 erfolgte das Absetzen des DSS und die Gabe von Trinkwasser bis zum Versuchsende. Die Kontrolltiere erhielten über den gesamten Zeitraum normales Trinkwasser. An Tag 9 erfolgte die Probenentnahme und Probenaufarbeitung. **(A)** Gewichtsverlauf in Gramm (g) über 9 Tage. **(B)** Stuhlkonsistenz dargestellt als Score. **(C)** Länge des entnommenen Dickdarms (in cm) vergleichend zwischen den drei Kohorten Ktrl, 1,5% DSS und 2,5% DSS, sowie die graphische Auswertung. **(D)** Länge des entnommenen Dünndarms (in cm) vergleichend zwischen den drei Kohorten Ktrl, 1,5% DSS und 2,5% DSS, sowie die graphische Auswertung. Graphen dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD von  $n = 3 - 5$  der entsprechenden Kohorten. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test. # = verglichen zur unbehandelten Kontrolle, #  $< 0,05$ ; \* = verglichen zwischen DSS behandelter Kohorte, \*  $< 0,05$ , \*\*  $< 0,01$ ; DSS = Dextransulfat-Natrium, Ktrl = Kontrolle

#### 4.2.2 Systemische Kynurenin- und 3-Hydroxyanthranilsäurekonzentrations-Bestimmungen

Innerhalb der CED-Patientenkohorte-Frankfurt (siehe Abschnitt 4.1) waren keine Veränderungen der Kynurenin- und 3-HAA-Konzentrationen im Blutplasma von Patienten in Remission festzustellen. Um weiter aufzuklären, inwieweit sich TRP-Metabolite im peripheren Blut prinzipiell als Biomarker zur Klassifizierung verschiedener intestinaler Entzündungsprozesse eignen, sollte nun der Einfluss einer aktiven intestinalen Inflammation auf die Konzentration von Kynurenin (erster Metabolit im TRP-Stoffwechsels) und 3-HAA (exemplarisch als Produkt des gesamten TRP-Stoffwechsels) mittels der in Abschnitt 4.2.1 generierten murinen Blutplasmaproben untersucht werden. Abbildung 7A zeigt die Kynurenin Konzentration im Blutplasma vergleichend von DSS behandelten zu unbehandelten C57BL/6 Mäusen. Die 1,5% DSS Konzentration verursachte einen Anstieg der Kynurenin Konzentration, wohingegen die 2,5% DSS Konzentration eine Reduktion der Kynurenin Konzentration hervorrief (Abbildung 7A). Auch die 3-HAA-Konzentration veränderte sich nach Behandlung mit DSS. Innerhalb der mit 2,5% DSS behandelten Kohorte waren keine signifikant reduzierten Konzentrationen von 3-HAA detektiert worden (Abbildung 7B). Somit zeigte sich im C57BL/6 Maussystem, dass eine aktive intestinale Inflammation Konzentrationsveränderungen von Kynurenin und 3-HAA im Blutplasma hervorruft. Hierbei ist bezüglich der weiteren Ergebnisse dieser Arbeit der unterschiedliche Einfluss einer moderaten (1,5% DSS) und starken (2,5% DSS) Inflammation auf die

Blutplasmakonzentrationen von Kynurenin und 3-HAA. Zwar erfolgten die weiteren Untersuchungen zum TRP-Stoffwechsel retrospektiv in Gewebeproben von CED-Patienten mit einer aktiven intestinalen Inflammation, da keine Plasmaproben zur Verfügung standen, jedoch verdeutlichten die Ergebnisse im Mausmodell, dass sich eine Folgestudie mit paralleler Analyse der TRP-Metabolite im Blut bei Patienten in einer aktiven Phase der CED lohnen könnte.



**Abbildung 7: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen DSS auf die Blutplasmakonzentrationen von Kynurenin und 3-HAA von C57BL/6 Mäusen.** Das Trinkwasser von C57BL/6 Mäusen wurde 6 Tage mit zwei (1,5% oder 2,5 %) unterschiedlichen Konzentrationen DSS versetzt. Die Gabe erfolgte ad libitum. An Tag 6 erfolgte das Absetzen des DSS und die Gabe von Trinkwasser bis zum Versuchsende. Die Kontrolltiere erhielten über den gesamten Zeitraum normales Trinkwasser. An Tag 9 erfolgte die Entnahme des Blutes retrobulbär vorgenommen. Unmittelbar nach Entnahme des Blutes erfolgte die Zentrifugation und die Aufbewahrung des Plasmas bei -80 °C. LC-MS/MS diente zur Analyse von (A) Kynurenin und (B) 3-HAA. Graphen dargestellt als Mittelwert +/- SD von n = 3 - 5 der entsprechenden Kohorten. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test. # = verglichen zur unbehandelten Kontrolle, # < 0,05; \* = verglichen zwischen DSS behandelter Kohorte, \* < 0,05, \*\* < 0,01; 3-HAA = 3-Hydroxyanthranilsäure, DSS = Dextransulfat-Natrium, Ktrl = Kontrolle

### **4.3 Analyse des lokalen Tryptophanstoffwechsels der CED-Patientenkohorte Bayreuth mit aktiver intestinaler Inflammation**

In den folgenden Abschnitten des zweiten Teils dieser Arbeit sind *ex vivo* Befunde aus aktiven CED-erkrankten Patienten (CED-Patientenkohorte-Bayreuth) unterstützend im Vergleich zu einem detaillierten *in vitro* Datensatz des TRP-Stoffwechsels in den an der CED-beteiligten Zelltypen dargestellt. Die erste Untersuchungsserie basiert auf IHC-Färbungen und umfasst die vergleichende Bestimmung des lokalen immunologischen Profils, lokaler Expressionen von Enzymen des TRP-Stoffwechsels, sowie der Analyse von lokalen Kynurenin und 3-HAA Spiegeln von CED-Subtypen. Ziel war hierbei die Identifizierung eines mukosalen Biomarkers, welcher zur Charakterisierung von CED-Subtypen beitragen kann, um Ansätze zu finden, durch eine Modulation des TRP-Stoffwechsels zukünftig spezifischere Therapien entwickeln zu können. Basierend auf diesen Erkenntnissen soll der *in vitro* Abschnitt die im GI-Trakt vorkommenden und an der Pathophysiologie von CED beteiligten Zelltypen charakterisieren, welche intrazellulär oder transzellulär Einfluss auf die Produktion von pro- und antiinflammatorischen TRP-Metaboliten haben. Durch die Aufteilung der Gewebeschnitte in Zellen des Immunsystems und des Darmepitheliums sollten die in der Histologie schwer zu differenzierenden TRP-Metabolitenströme besser erkennbar gemacht werden. Wie sich im Laufe der Analysen zeigte, scheint ein veränderter TRP-Stoffwechsel nicht nur bei CED-Erkrankungen, sondern auch bei den inflammations-induzierenden (*inflammation-induced*) Krebserkrankungen eine Rolle zu spielen.

#### **4.3.1 Charakterisierung der CED-Patientenkohorte-Bayreuth**

Zur eindeutigen Zuordnung wird die CED-Kohorte, die in Tabelle 17 dargestellt ist, als CED-Patientenkohorte-Bayreuth bezeichnet. Insgesamt sind von gesunden Probanden (Ktrl, n = 12), sowie MC (n = 12) und CU (n = 7) Patienten Gewebeproben akquiriert worden. Innerhalb der Kontrollkohorte und der MC Kohorte wurde versucht, Gewebeproben von zwei unterschiedlichen Lokalisationen (Ileum und Kolon) pro Probanden/Patienten zu sammeln. Innerhalb der CU Kohorte konnten lediglich Gewebeproben des Kolons akquiriert werden. Mit Hilfe des *Riley Scores* (Remission 1, aktive Inflammation 1-3) ist dargestellt, dass alle Gewebeproben der MC und CU Patienten eine aktive Inflammation aufzeigen. Vergleichend dazu wiesen die

Probanden in der Kontrollkohorte keine Inflammation auf (*Riley Score* = 0). Zur eindeutigen Klassifizierung werden die entzündeten Gewebeproben der CED-Patienten im Folgenden als Ileum-assoziiertes MC (iMC), als Kolon-assoziiertes MC (kMC) und Kolon-assoziierte CU (kCU) bezeichnet. Die entsprechenden Gewebeproben der gesunden Probanden werden nach der Lokalisation der Entnahme bezeichnet. iKtrl dient hierbei als Bezeichnung der Gewebeproben nicht entzündeter Probanden des Ileums und kKtrl als Bezeichnung der Gewebeproben nicht entzündeter Probanden des Kolons.

**Tabelle 17: Klinische Charakteristika der CED-Patientenkohorten-Bayreuth und Ursprung der Gewebeproben.** Patienten mit aktivem Morbus Crohn (MC) und aktiver Colitis ulcerosa (CU), sowie gesunde Probanden (Ktrl) wurde inkludiert und Gewebeproben aus unterschiedlichen Regionen des Dünn (Ileum)- und Dickdarms (Kolon) akquiriert. Es erfolgte eine vergleichende Analyse von Ktrl zu MC und CU, sowie zwischen MC und CU. Die Befundungen der Gewebeproben sind von einem erfahrenen Pathologen durchgeführt worden und anhand des Riley Scores dargestellt.

	<b>Kontrolle (Ktrl)</b>	<b>Morbus Crohn (MC)</b>	<b>Colitis ulcerosa (CU)</b>
<b>n</b>	12	12	7
<b>Alter (Jahr, Durchschnitt <math>\pm</math> SD)</b>	31 $\pm$ 11	41 $\pm$ 17	46 $\pm$ 18
<b>Geschlecht (m/w)</b>	8/4	5/7	5/2
<b>Jahr der Diagnose</b>			
2015	-	11	6
2016	-	1	1
<b>Lokalisation Biopsie (Anzahl Proben)</b>			
Dünndarm (Ileum)	9	9	-
Dickdarm (Kolon)	8	5	7
<b>Histologie Aktivitätsscore</b>			
Riley Score (Durchschnitt, Bereich)			
Gesamt	0	3 (2-4)	2.3 (2-3)
Dünndarm (Ileum)	0	3.2 (2-4)	-
Dickdarm (Kolon)	0	2.8 (2-4)	2.3 (2-3)

CU = Colitis ulcerosa, Ktrl = Kontrolle, m = männlich, MC = Morbus Crohn, SD = Standardabweichung, w = weiblich

### **4.3.2 Analyse des lokalen immunologischen Profils bei CED-Patienten**

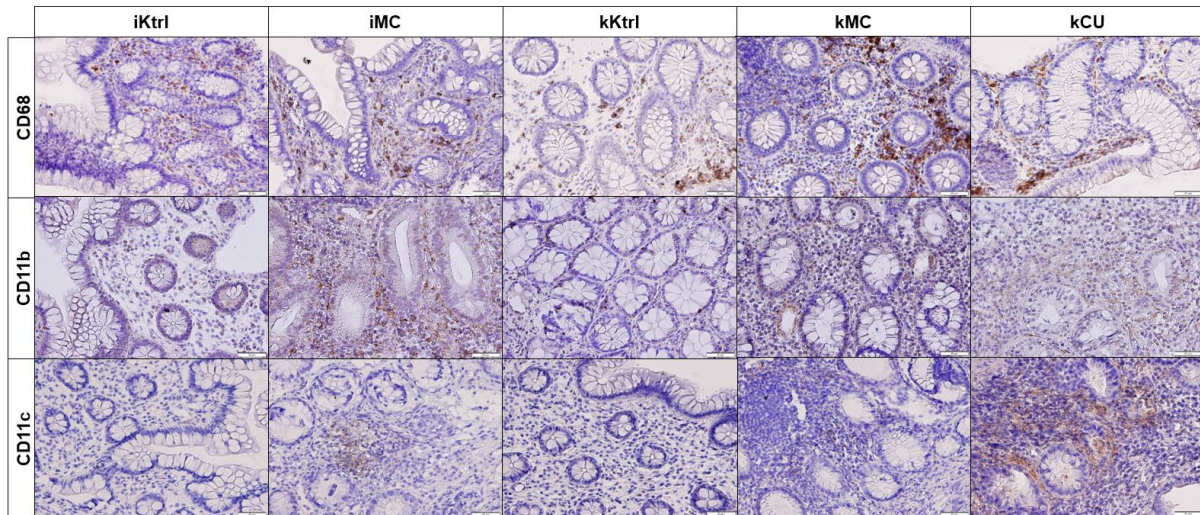
In einer ersten Analyse der intestinalen Gewebeproben sollte die entzündungsinduzierte Infiltration von Immunzellen vergleichend zwischen den Kontrollkohorten, sowie der MC und CU Kohorten untersucht werden. Im Weiteren sollten Unterschiede zwischen den CED-Subtypen, also entzündeten Gewebeproben von Ileum-assoziiertem MC (iMC), Kolon-assoziiertem MC (kMC), sowie Kolon-assoziiierter CU (kCU) detektiert werden. Ziel war es charakteristische Unterschiede im lokalen immunologischen Profil festzustellen, welche spezifisch für die einzelnen CED-Subtypen sind. Im späteren Verlauf sollten dann die intestinalen Enzymexpressionen des TRP-Stoffwechsels diesen immunologischen Profilen zugeordnet und charakteristische und CED-spezifische Muster des Immunmetabolismus identifiziert werden.

#### **4.3.2.1 Antigenpräsentierende Zellen**

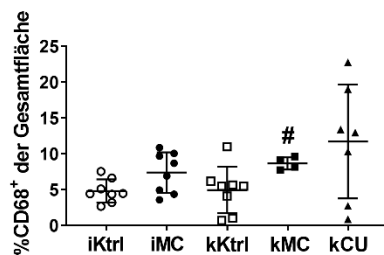
Abbildung 8 zeigt die IHC-Analysen von infiltrierenden Antigenpräsentierenden Zellen (APC) der CED-Patientenkohorte-Bayreuth. Dies beinhaltete die Analyse von CD68+ Makrophagen, CD11b+ Dendritischen Zellen und CD11c+ Dendritischen Zellen. Auffallend war, dass sowohl die Gewebeproben der Probanden als auch die der Patienten lediglich im interstitiellen Gewebe der Darmwand positiv für APC Marker waren (Abbildung 8A). Zellen der Lieberkühn-Krypten wiesen dagegen keine positive Färbung auf und verdeutlichten, dass es zu keiner Infiltration von APCs in die intraepitheliale Schicht kam. Eine signifikant erhöhte Infiltration von CD68+ Makrophagen fand sich lediglich in Gewebeproben der kMC Patienten im Vergleich zu kKtrl Probanden wieder (Abbildung 8B). In Gewebeproben von iMC Patienten fiel dagegen eine erhöhte Infiltration von CD11b+ Zellen im Vergleich zu Gewebeproben der iKtrl Probanden auf (Abbildung 8C). Im Weiteren verdeutlichten die IHC-Analysen, dass es signifikante Unterschiede der CD11b+ Zellinfiltration zwischen Gewebeproben von iMC und kCU Patienten gab. Gewebeproben von iMC Patienten zeigten hierbei eine deutlich höhere Infiltration von CD11b+ Zellen, als Gewebeproben von kCU Patienten. Bei der Detektion von CD11c+ Zellen wiesen alle Gewebeproben der CED-Subtypen signifikant erhöhte Infiltrationen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen auf (Abbildung 8D). Zusammenfassend verdeutlichen die hier gezeigten

Daten das Vorhandensein von charakteristischen immunologischen Profilen innerhalb der MC Subtypen. Während in Gewebeproben von iMC Patienten eine erhöhte Infiltration von CD11b+ Zellen detektierbar war, zeigten Gewebeproben von kMC Patienten eine erhöhte Infiltration von CD68+ Zellen.

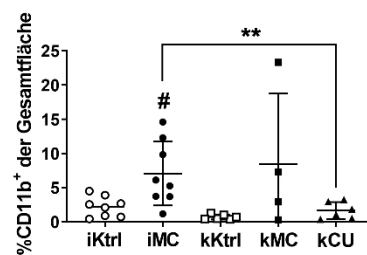
A



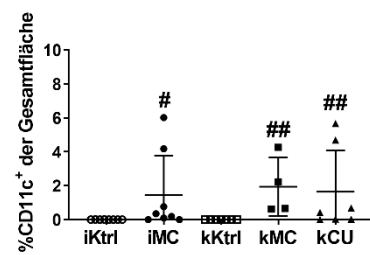
B



C



D



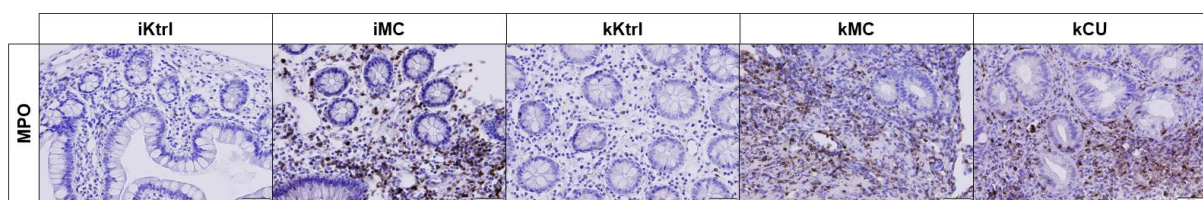
**Abbildung 8: IHC-Analysen zur Detektion von infiltrierenden Antigenpräsentierenden Zellen in intestinalen Gewebeproben von CED-Patienten mit aktiver Inflammation.** (A) Analyse der CD68, CD11b und CD11c Proteinexpressionen in FFPE Gewebeproben von MC und CU Patienten mittels IHC (repräsentative Bilder, Vergrößerung 20x). Der Vergleich von entzündetem Gewebe von MC und CU Patienten erfolgte sowohl miteinander als auch mit (nicht-entzündetem) gesundem Kontrollgewebe (Ktrl). Differenziell quantitative und lokalisationsabhängige Analyse des prozentualen (%) Anteiles an der Gesamtfläche von (B) CD68+, (C) CD11b+ und (D) CD11c+ infiltrierenden Antigenpräsentierenden Zellen. Graphen dargestellt als Mittelwert +/- SD von n = 4 – 9. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test. # = verglichen zu gesundem Gewebe, # < 0,05, ## < 0,01; \* = verglichen zwischen entzündetem Gewebe, \* < 0,05, \*\* < 0,01; CED = chronisch-entzündliche Darmerkrankung, FFPE = Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet, iKtrl = nicht-entzündetes Ileum-Kontrollgewebe, iMC = entzündetes-Ileum Gewebe von Morbus Crohn Patienten, kCU = entzündetes

Kolon-Gewebe von Colitis ulcerosa Patienten, kKtrl = nicht-entzündetes Kolon-Kontrollgewebe, kMC = entzündetes Kolon-Gewebe von Morbus Crohn Patienten

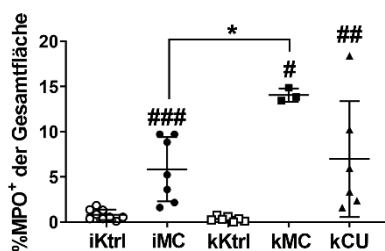
#### 4.3.2.2 Neutrophile Granulozyten

Zur Detektion von infiltrierenden Neutrophilen Granulozyten diente die Myeloperoxidase (MPO) als gewebsspezifischer Marker. Entgegen der Analyse von infiltrierenden APCs (siehe Abschnitt 4.3.2.1), wiesen nicht nur Zellen innerhalb des interstitiellen Gewebes der Darmwand, sondern auch infiltrierende Zellen ins Epithel der Lieberkühn-Krypten positive Signale für MPO auf (Abbildung 9A). In allen entzündeten Gewebeproben war eine MPO Proteinexpression detektierbar, wobei in nicht entzündetem Gewebe nur wenige MPO+ Zellen vorhanden waren (Abbildung 9A und 9B). Gewebeproben von iMC, kMC und kCU Patienten wiesen signifikante Infiltrationen von MPO+ Zellen im Vergleich zum jeweiligen Kontrollgewebe auf (Abbildung 9B). Zu beobachten war, dass es signifikante Unterschiede zwischen Gewebeproben von iMC und kMC Patienten gab. In den Gewebeproben von kMC Patienten zeigten sich deutlich mehr MPO+ Zellen, als in Gewebeproben von iMC Patienten. Somit fielen parallel zu der Analyse von APCs (siehe Abschnitt 4.3.2.1) auch bei der Untersuchung von infiltrierenden MPO+ Zellen charakteristische Unterschiede der MC Subtypen, iMC und kMC, auf.

A



B





**Abbildung 9: IHC-Analysen zur Detektion von infiltrierenden Neutrophilen Granulozyten in intestinalen Gewebeproben von CED-Patienten mit aktiver Inflammation.** (A) Analyse der MPO Proteinexpressionen in FFPE Gewebeproben von MC und CU Patienten mittels IHC (repräsentative Bilder, Vergrößerung 20x). Der Vergleich von entzündetem Gewebe von MC und CU Patienten erfolgte sowohl miteinander als auch mit (nicht-entzündetem) gesundem Kontrollgewebe (Ktrl). Differentiell quantitative und lokalisationsabhängige Analyse des prozentualen (%) Anteiles an der Gesamtfläche von (B) MPO+ infiltrierenden Neutrophilen Granulozyten. Graphen dargestellt als Mittelwert +/- SD von  $n = 3 - 9$ . Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test. # = verglichen zu gesundem Gewebe, # < 0,05, ## < 0,01, ### < 0,001; \* = verglichen zwischen entzündetem Gewebe, \* < 0,05, CED = chronisch-entzündliche Darmerkrankung, FFPE = Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet, iKtrl = nicht-entzündetes Ileum-Kontrollgewebe, iMC = entzündetes Ileum-Gewebe von Morbus Crohn Patienten, kCU = entzündetes Kolon-Gewebe von Colitis ulcerosa Patienten, kKtrl = nicht-entzündetes Kolon Kontrollgewebe, kMC = entzündetes Kolon-Gewebe von Morbus Crohn Patienten, MPO = Myeloperoxidase

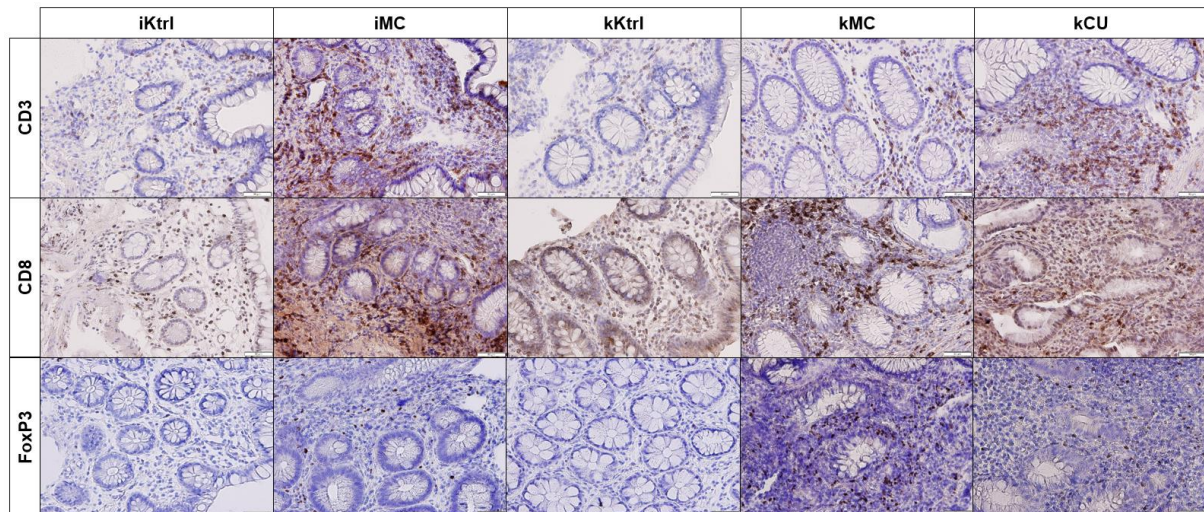
#### 4.3.2.3 T Lymphozyten

Die Lymphozyten spezifischen Marker CD3, CD8 und *Forkhead-Box-Protein P3* (FoxP3) dienen zum Nachweis infiltrierender T Zellen. CD3 charakterisiert dabei die gesamte T Zell Population, wohingegen CD8 die zytotoxische und FoxP3 die regulatorische T Zell Population definiert. In den entzündeten Gewebeproben war zu beobachten, dass CD3 und CD8 im interstitiellen Gewebe der Darmwand nachweisbar waren, aber auch in die Lieberkühn-Krypten infiltrierten Zellen. FoxP3+ Zellen dagegen waren nur im Stroma detektierbar (Abbildung 10A). In den Gewebeproben von iMC und kCU fanden sich signifikant erhöhte CD3+ Zell Infiltrationen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgeweben wieder (Abbildung 10B). Auffallend war jedoch der signifikante Unterschied der Anzahl von CD8-färbbarer Zellen zwischen jeweils kCU und iMC, sowie kCU und kMC (Abbildung 10C). Gewebeproben von kCU Patienten wiesen hierbei deutlich geringere CD8+ Zellzahlen als Gewebeproben von iMC und kMC auf. Bei der Analyse von FoxP3+ Zellen fielen wiederum Unterschiede zwischen Gewebeproben von iMC und kMC Patienten auf (Abbildung 10D). Gewebeproben von kMC Patienten zeigten hierbei eine deutlich höhere Anzahl an FoxP3+ Zellen, als iMC Patienten. Zusammenfassend und in Übereinstimmung der Analysen der APCs, sowie Neutrophilen Granulozyten, verdeutlichte auch die Analyse von infiltrierenden T Zellen charakteristische Unterschiede zwischen den CED-Subtypen. Die größten

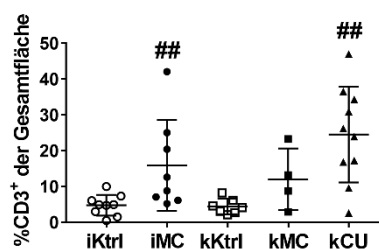


Unterschiede sind hierbei die Abweichungen im CD8 Profil von CU zu MC Patienten, sowie im FoxP3 Profil zwischen iMC und kMC.

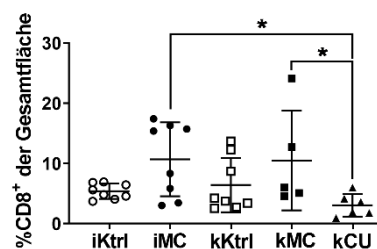
A



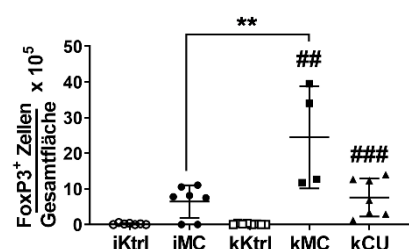
B



C



D



**Abbildung 10: IHC-Analysen zur Detektion von infiltrierenden T Zellen in intestinalen Gewebeproben von CED-Patienten mit aktiver Inflammation.** (A) Analyse der CD3, CD8 und FoxP3 Proteinexpressionen in FFPE Gewebeproben von MC und CU Patienten mittels IHC (repräsentative Bilder, Vergrößerung 20x). Der Vergleich von entzündetem Gewebe von MC und CU Patienten erfolgte sowohl miteinander als auch mit (nicht-entzündetem) gesundem Kontrollgewebe (Ktrl). Differenziell quantitative und lokalisationsabhängige Analyse des prozentualen (%) Anteiles an der Gesamtfläche von (B) CD3+, (C) CD8+ und (D) FoxP3+ infiltrierenden T Zellen. Für die Analyse von FoxP3 erfolgte die Berechnung über das Verhältnis der gezählten positiven Zellen zur Gesamtfläche ( $\mu\text{m}^2$ ) und beinhaltet zur besseren Visualisierung die Multiplikation mit dem Faktor  $10^5$ . Graphen dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD von  $n = 4 - 9$ . Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test. # = verglichen zu gesundem Gewebe, # < 0,05, ## < 0,01, ### < 0,001; \* = verglichen zwischen entzündetem Gewebe, \* < 0,05, \*\* < 0,01; CED = chronisch-entzündliche Darmerkrankung, FFPE = Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet, FoxP3 = *Forkhead-Box-Protein P3*, iKtrl = nicht-entzündetes Ileum-Kontrollgewebe, iMC = entzündetes Ileum-Gewebe von Morbus Crohn Patienten,

kCU = entzündetes Kolon-Gewebe von Colitis ulcerosa Patienten, kKtrl = nicht-entzündetes Kolon-Kontrollgewebe, kMC = entzündetes Kolon-Gewebe von Morbus Crohn Patienten

#### **4.3.2.4 Zusammenfassung des CED-Subtypen spezifischen immunologischen Profils bei Patienten mit aktiver Inflammation**

Zur am Anfang gestellten Fragestellung, ob und inwiefern es Unterschiede im intestinalen immunologischen Profil zwischen CED-Subtypen gibt, fasst Tabelle 18 die bisherigen Ergebnisse zusammen. Während sich die IHC-Analysen der Immunzellmarker MPO und FoxP3 besonders zur Unterscheidung von iMC zu kMC eignen, eignet sich die intestinale Proteinexpression von CD8 zur Differenzierung von iMC zu kUC, sowie von kMC zu kCU. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass es zu einer generellen entzündungsinduzierten und lokalisationsspezifischen Immunzellinfiltration in Gewebe von CED-Patienten kommt. Im Folgenden soll nun gezeigt werden, welche am TRP-Stoffwechsel beteiligten Enzyme durch diese Immunzellinfiltration ins Gewebe hineingetragen werden.

**Tabelle 18: Zusammenfassung des intestinalen immunologischen Profils von CED-Subtypen.**

Dargestellt sind die zusammengefassten Proteinexpressionen der Immunzellmarker im Gewebe von CED Patienten mit aktiver Inflammation. Die Analysen erfolgten vergleichend zwischen MC Subtypen (iMC vs. kMC), sowie zwischen MC Subtypen mit kCU Subtypen (iMC vs. kCU, kMC vs. kCU). Die schwarzen Pfeile symbolisieren eine Überexpression (↑) oder Unterexpression (↓) des jeweiligen Markers.

	iMC vs. kMC	iMC vs. kCU	kMC vs. kCU
<b>Antigenpräsentierende Zellen</b>			
CD68	/	/	/
CD11b	/	iMC ↑	/
CD11c	/	/	/
<b>Neutrophile Granulozyten</b>			
MPO	iMC ↓	/	/
<b>T Zellen</b>			
CD3	/	/	/
CD8	/	iMC ↑	kMC ↑
FoxP3	iMC ↓	/	/

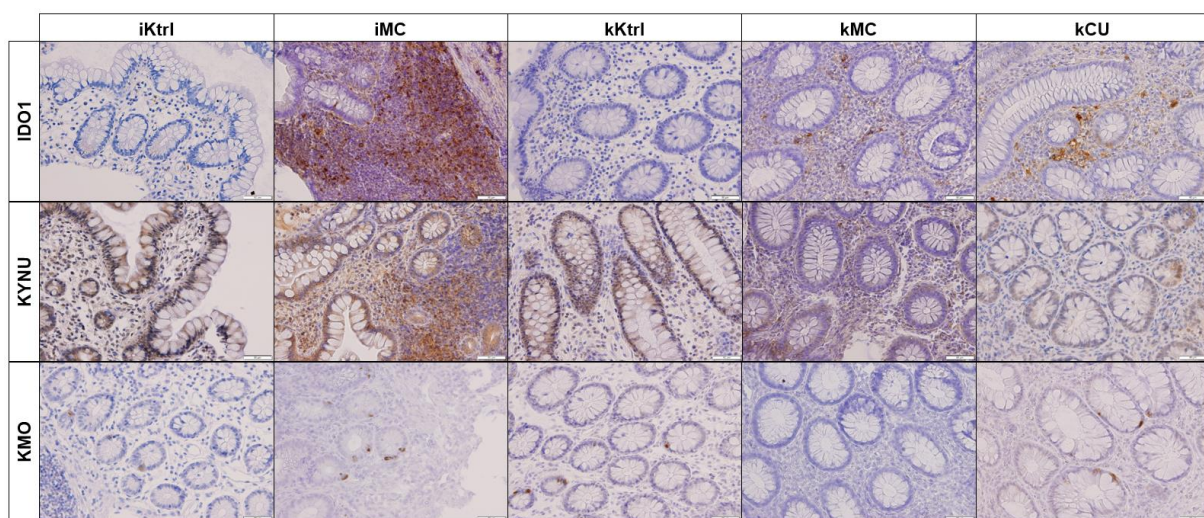
CED = chronisch-entzündliche Darmerkrankung, FoxP3 = *Forkhead-Box-Protein P3*, iMC = entzündetes Ileum-Gewebe von Morbus Crohn Patienten, kCU = entzündetes Kolon-Gewebe von Colitis ulcerosa Patienten, kMC = entzündetes Kolon-Gewebe von Morbus Crohn Patienten, MPO = Myeloperoxidase, vs. = versus

#### **4.3.3 Analyse des lokalen Expressionsprofils von Enzymen des Tryptophanstoffwechsels bei CED-Patienten mit aktiver Inflammation**

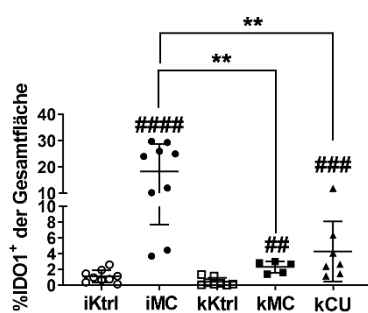
Da die Ergebnisse in Abschnitt 4.1 verdeutlichen, dass sich der systemische TRP-Stoffwechsel im humanen Blutplasma nicht als Biomarker zur Unterscheidung von CED-Patienten in Remission eignet, sowie die in 4.2 dargestellten murinen Ergebnisse vermuten lassen, dass ein Effekt nur bei aktiver intestinaler Inflammation zu beobachten ist, sollte nun der lokale TRP-Stoffwechsel in aktiv entzündeten intestinalen Gewebeproben von CED-Patienten untersucht werden, um potentielle Biomarker von CED-Subtypen zu identifizieren. Wie auch schon in Abschnitt 4.1.2, erfolgte die Klassifizierung der CED-Kohorten nach der anatomischen und lokalisationsabhängigen Inflammation. In Abbildung 11 sind die Proteinexpressionen von Indolamin-2,3-Dioxygenase 1 (IDO1), Kynureninase (KYNU) und Kynurenin-3-Monooxygenase (KMO) der CED-Patientenkohorte-Bayreuth dargestellt. Aufgrund fehlender signifikanter Unterschiede ist auf eine Darstellung der Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO) Proteinexpression verzichtet worden (Abbildung S6). Auffallend ist die zellspezifische Lokalisation der Enzymexpressionen. Während die IDO1 Proteinexpression ausschließlich im interstitiellen Gewebe der Darmwand zu detektieren war, fiel eine KYNU Proteinexpression, sowohl im interstitiellen Gewebe der Darmwand als auch in den Zellen der Lieberkühn-Krypten auf (Abbildung 11A). Eine KMO Proteinexpression dagegen, zeigte sich ausschließlich in den Zellen der Lieberkühn-Krypten (Abbildung 11A). Die Gewebe der Kontrollkohorte, iKtrl und kKtrl, wiesen nur eine sehr geringe Proteinexpression von IDO1 auf (Abbildung 11B). Dagegen verdeutlichten die entzündeten Gewebeproben der CED-Subtypen alle eine signifikant erhöhte IDO1 Proteinexpression im Vergleich zur jeweiligen Kontrollkohorte. Interessanterweise wiesen Gewebeproben von iMC die stärkste IDO1 Proteinexpression auf. Diese starke IDO1 Proteinexpression in Gewebeproben von iMC Patienten war signifikant erhöht im Vergleich zu den Gewebeproben der kMC und kCU Kohorten. Unterschiede im IDO1 Proteinexpressionsprofil zwischen kMC und kCU waren dagegen nicht feststellbar. Besonders zu erwähnen ist das KYNU Proteinexpressionsprofil. Lediglich in den Gewebeproben von iMC Patienten fiel eine signifikant erhöhte KYNU Proteinexpression im Vergleich zum Gewebe der Kontrollkohorten auf (Abbildung 11C). Zusätzlich verdeutlichen die Ergebnisse, dass die KYNU Proteinexpression der iMC Patienten in Gewebeproben sowohl zur KYNU

Expression der kMC als auch der kCU Patienten erhöht war. Spezifisch für die Gewebeproben der kMC Kohorte ist das Ausbleiben einer KMO Proteinexpression (Abbildung 11D). Diese fehlende Proteinexpression von KMO zeigte signifikante Unterschiede zu den Gewebeproben der kCU Kohorte auf. Insgesamt ließen sich anhand der IHC-Analysen zusammenfassend besonders zwei Merkmale des lokalen Proteinexpressionsprofils von Enzymen des TRP-Stoffwechsels bei CED-Patienten beobachten. Während bei iMC Patienten eine Überexpression der KYNU zu identifizieren war, fiel in kMC Patienten eine fehlende KMO Proteinexpression auf.

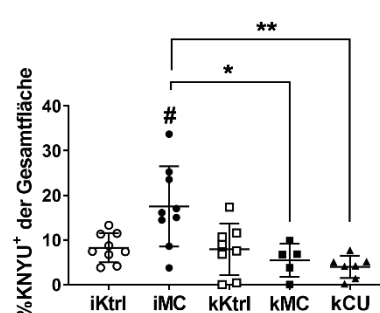
A



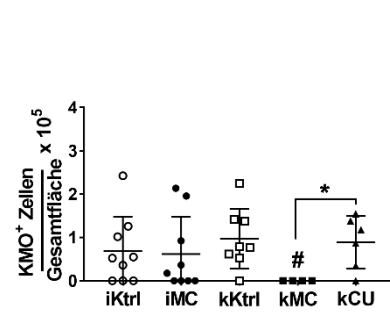
B



C



D



**Abbildung 11: IHC-Analysen zur Detektion von Enzymen des TRP-Stoffwechsels in intestinalen Gewebeproben von CED-Patienten mit aktiver Inflammation.** (A) Analyse der IDO1, KYNU und KMO Proteinexpressionen in FFPE Gewebeproben von MC und CU Patienten mittels IHC (repräsentative Bilder, Vergrößerung 20x). Der Vergleich von entzündetem Gewebe von MC und CU Patienten fand sowohl zwischen den CED-Kohorten als auch mit (nicht-entzündetem) gesundem Kontrollgewebe (Ktrl) statt. Differentiell quantitative und lokalisationsabhängige Analyse des prozentualen (%) Anteiles an der Gesamtfläche von (B) IDO1+, (C) KYNU+ und (D) KMO+ Zellen. Die

KMO Analyse erfolgte mittels der Berechnung des Verhältnisses der gezählten positiven Zellen zur Gesamtfläche ( $\mu\text{m}^2$ ) und beinhaltet die Multiplikation mit dem Faktor  $10^5$  zur besseren Visualisierung. Graphen dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD von  $n = 4 - 9$ . Statistische Analyse durchgeführt mit dem Mann-Whitney-Test. # = verglichen zu gesundem Gewebe, # < 0,05, ## < 0,01, ### < 0,001, #### < 0,0001; \* = verglichen zwischen entzündetem Gewebe, \* < 0,05, \*\* < 0,01; CED = chronisch entzündliche-Darmerkrankung, FFPE = Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet IDO1 = Indolamin-2,3-Dioxygenase 1, iKtrl = nicht-entzündetes Ileum-Kontrollgewebe, iMC = entzündetes Ileum-Gewebe von Morbus Crohn Patienten, kCU = entzündetes Kolon-Gewebe von Colitis ulcerosa Patienten, kKtrl = nicht-entzündetes Kolon-Kontrollgewebe, kMC = entzündetes Kolon-Gewebe von Morbus Crohn Patienten, KMO = Kynurenin-3-Monooxygenase, KYNU = Kynureninase

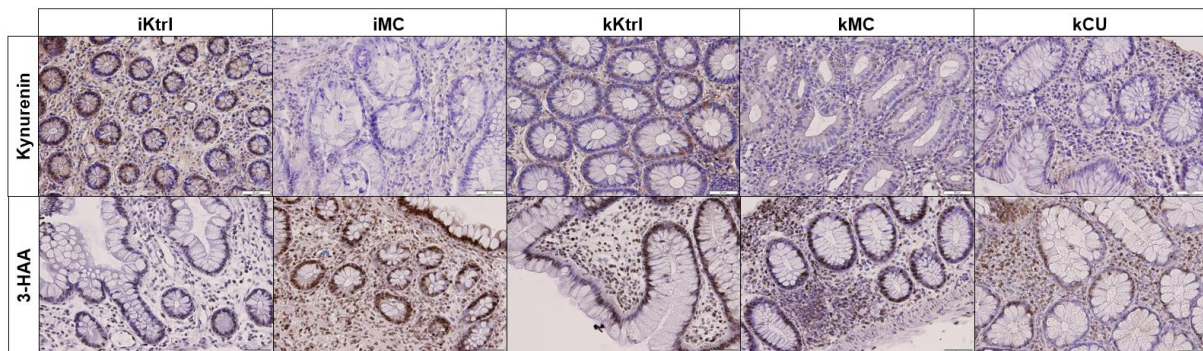
#### **4.3.4 Analyse der lokalen Kynurenin- und 3-Hydroxyanthranilsäureniveaus bei CED-Patienten**

Neben den Proteinexpressionen der Enzyme des TRP-Stoffwechsels sollten entsprechend dazu Unterschiede der lokalen Metabolitpräsenz untersucht werden. Hierfür wurden Kynurenin, welches als Produkt der enzymatischen Spaltung von IDO1 entsteht und als Substrat für KYNU und KMO dient, und 3-HAA, das als Produkt der enzymatischen Spaltung von KYNU entsteht, gewählt. In Abbildung 12A sind die IHC-Analysen von Kynurenin und 3-HAA in intestinalen Gewebeproben der CED-Patientenkohorte-Bayreuth dargestellt. Positive Signal der beiden Metabolite fanden sich sowohl im interstitiellen Gewebe der Darmwand, als auch in den Zellen der Lieberkühn-Krypten wieder (Abbildung 12A). Die Ergebnisse der IHC-Analysen zur Detektion von Kynurenin verdeutlichen, dass sich trotz der hohen IDO1 Proteinexpression in Gewebeproben von iMC Patienten, die Kynureninniveaus signifikant reduzierten, sowohl zu Gewebeproben der iKtrl Kohorte als auch zu Gewebeproben der kMC Kohorte (Abbildung 12B). Zudem zeigten die Gewebeproben der kCU Kohorte eine signifikant reduzierte Konzentration von Kynurenin im Vergleich zu den Gewebeproben der kMC Kohorte. Bei der Analyse von 3-HAA fielen lediglich in den Gewebeproben zwischen den beiden Kohorten iMC und iKtrl signifikante Unterschiede auf (Abbildung 12C). Gewebeproben von iMC Patienten wiesen hierbei eine signifikant stärkere Färbintensität an 3-HAA auf, was zur erhöhten KYNU Proteinexpression in 4.3.3 (Abbildung 11C) passt. Als Maß zur Bestimmung der KYNU Enzymaktivität diente der Quotient von 3-HAA (Produkt der KYNU) zu Kynurenin (Substrat der KYNU). Hierbei zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den



beiden Kohorten iMC und kMC auf (Abbildung 12D). Während in den Gewebeproben der iMC Patienten eine sehr hohe 3-HAA/Kynurenin Ratio vorlag, zeigten die kMC Gewebeproben lediglich eine geringe 3-HAA/Kynurenin Ratio, welche auch keine Unterschiede zur kKtrl Kohorte aufwiesen. Zusammenfassend war anhand der lokalen gewebspezifischen Bestimmung von Kynurenin und 3-HAA ein spezifisches Muster der iMC Patienten zu beobachten, welches sich vom Kynurenin und 3-HAA Metabolitmuster der kMC Patienten deutlich abgrenzen lässt.

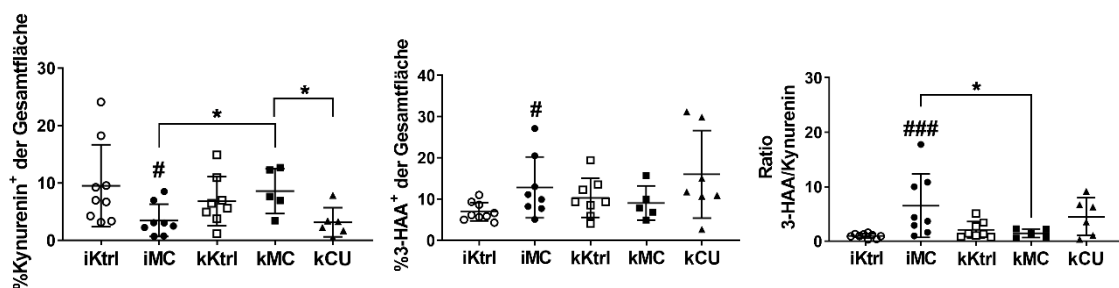
A



B

C

D

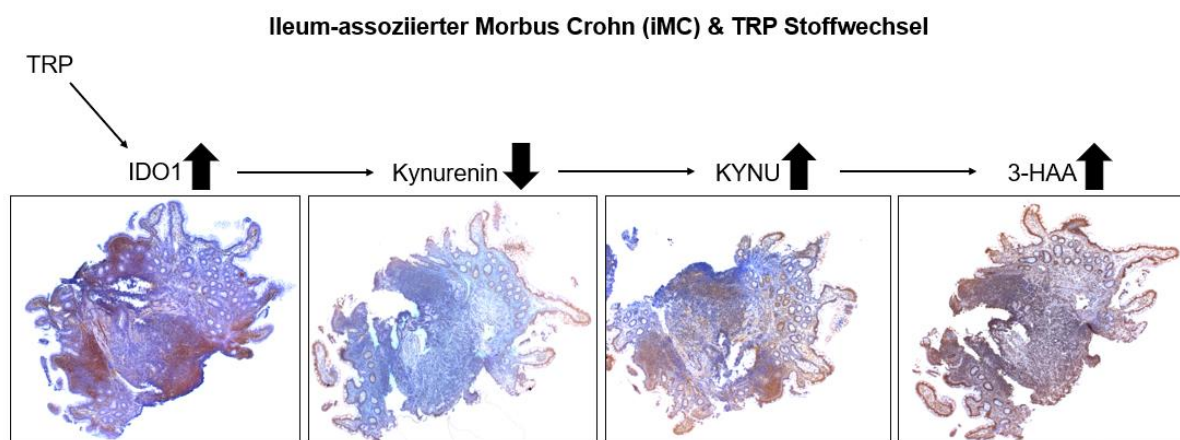


**Abbildung 12: IHC-Analysen zur Detektion von Kynurenin und 3-HAA in intestinalen Gewebeproben von CED-Patienten mit aktiver Inflammation. (A)** Analyse von Kynurenin und 3-HAA in FFPE Gewebeproben von MC und CU Patienten mittels IHC (repräsentative Bilder, Vergrößerung 20x). Der Vergleich von entzündetem Gewebe von MC und CU Patienten erfolgte sowohl miteinander als auch mit (nicht-entzündetem) gesundem Kontrollgewebe (Ktrl). Differenziell quantitative und lokalisationsabhängige Analyse des prozentualen (%) Anteiles an der Gesamtfläche von **(B)** Kynurenin und **(C)** 3-HAA. **(D)** Darstellung der Ratio zwischen 3-HAA zu Kynurenin. Graphen dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD von  $n = 4 - 9$ . Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test. # = verglichen zu gesundem Gewebe, # < 0,05, ## < 0,01, ### < 0,001; \* = verglichen zwischen entzündetem Gewebe, \* < 0,05; 3-HAA = 3-Hydroxyanthranilsäure, CED = chronisch-entzündliche Darmerkrankung, iKtrl = nicht-entzündetes Ileum-Kontrollgewebe, iMC = entzündetes Ileum-Gewebe von Morbus Crohn Patienten, kCU = entzündetes Kolon-Gewebe von Colitis ulcerosa Patienten,

kKtrl = nicht-entzündetes Kolon-Kontrollgewebe, kMC = entzündetes Kolon-Gewebe von Morbus Crohn Patienten

#### 4.3.5 Zusammenfassung des lokalen Tryptophanstoffwechsels bei Ileum-assoziiertem Morbus Crohn

Eine Veränderung des lokalen TRP-Stoffwechsels war besonders bei iMC Patienten zu beobachten. In Abbildung 13 ist der gesamte TRP-Stoffwechsel bei iMC Patienten dargestellt. Eine erhöhte IDO1 Proteinexpression war gefolgt von einer Reduktion des lokalen Kynureninniveaus, welches sich durch eine Überexpression der KYNU begründen lässt. Diese erhöhte KYNU Proteinexpression rief wiederum eine erhöhte Konzentration an 3-HAA hervor. Zusätzlich bestätigt die erhöhte Ratio von 3-HAA/Kynurenine einen Anstieg der enzymatischen Umsatzrate der Kynureninase (siehe Abbildung 12D). Um auf die am Anfang gestellte Frage, nach mukosalen Biomarkern zur Differenzierung von CED-Subtypen einzugehen, soll der folgende Abschnitt Klarheit verschaffen.



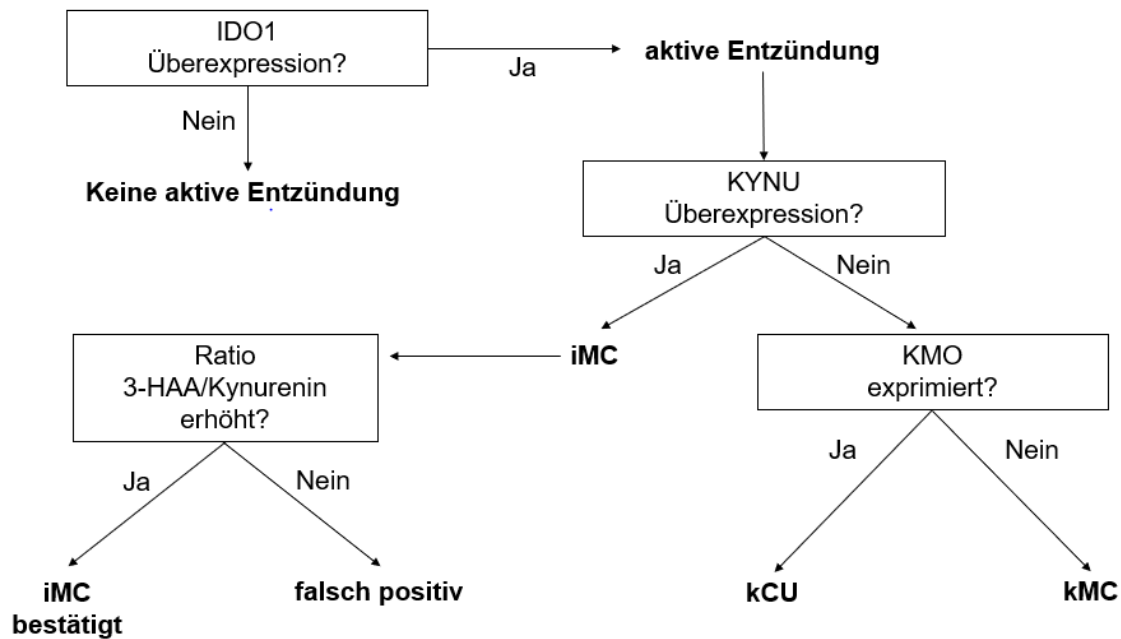
**Abbildung 13: Überblick des lokalen intestinalen TRP-Stoffwechsels bei iMC.** Dargestellt ist die serielle IHC-Analyse von Enzymen (IDO1 und KYNU), sowie Metaboliten (Kynurenin und 3-HAA) des TRP-Stoffwechsels eines iMC Patienten (repräsentativ, 4x Vergrößerung). Die entzündungsinduzierte Aktivierung des TRP-Stoffwechsels ist besonders bei iMC zu beobachten. Ein Anstieg der IDO1 Proteinexpression ist gefolgt durch eine Abnahme der lokalen Kynurenin Konzentration, die durch eine Überexpression der KYNU hervorgerufen wird. Dies führt zu einem Anstieg des lokalen 3-HAA-Niveaus im Gewebe und ist charakteristisch für iMC. 3-HAA = 3-Hydroxyanthranilsäure, IDO1 = Indolamin-2,3-Dioxygenase 1, iMC = entzündetes Ileum-Gewebe von Morbus Crohn Patienten, KYNU = Kynureninase, TRP = Tryptophan



#### **4.3.6 Schema zur Klassifizierung von CED-Subtypen mit Hilfe des Tryptophanstoffwechsels und immunhistochemischen-Analysen**

Mittels gewonnener Daten der IHC-basierten Analysen von Enzyme und Metabolite des TRP-Stoffwechsels in intestinalen Gewebeproben von CED-Patienten konnte eine neue Kombinatorik zur Klassifizierung in CED-Subtypen entwickelt werden. Abbildung 14 zeigt eine schematische Vorgehensweise zur Charakterisierung der CED-Gewebeproben. Die IDO1 Proteinexpression entscheidet, ob eine aktive Inflammation in der entsprechenden Gewebeprobe vorliegt. Ist dies zutreffend, kann eine Analyse der KYNU Proteinexpression eine klare Abgrenzung von iMC zu kMC und kCU gewährleisten. Liegt eine Überexpression der KYNU vor, handelt es sich um iMC, was letztendlich final mit einer erhöhten lokalen 3-HAA/Kynurenine Ratio bestätigt werden kann. Zur Differenzierung von kMC zu kCU dient eine Proteinexpressionsanalyse von KMO. Ist keine erhöhte KYNU Expression nachzuweisen und ist in der gleichen Gewebeprobe keine KMO zu detektieren, handelt es sich um den kCU CED-Subtyp. Liegt dagegen eine KMO Proteinexpression vor, ist anzunehmen, dass es sich um den kMC CED-Subtyp handelt. Zusätzlich sind die im Ergebnisteil 4.3.2 erzeugten Daten der Analyse des lokalen immunologischen Profils zur weiteren Bestätigung zu verwenden. Hier eignen sich besonders die Immunzellmarker MPO, CD8 und FoxP3. Somit lässt sich abschließend zusammenfassen, dass sich die kombinatorischen IHC-Analysen der TRP-Stoffwechselenzyme IDO, KYNU und KMO, sowie die 3-HAA/Kynurenin Ratio als Biomarker zur Unterscheidung der CED-Subtypen iMC, kMC und kCU eignen.

### Kombinatorik zur Identifizierung von CED Subtypen mittels IHC und des TRP Stoffwechsels



**Abbildung 14: Schematische Darstellung zur Unterscheidung von iMC, kMC und kCU mittels IHC-basierter Kombinatorik des intestinalen TRP-Stoffwechsels.**  
 3-HAA = 3-Hydroxyanthranilsäure, CED = chronisch-entzündliche Darmerkrankung, IDO1 = Indolamin-2,3-Dioxygenase 1, iMC = entzündetes Ileum-Gewebe von Morbus Crohn Patienten, kCU = entzündetes Kolon-Gewebe von Colitis ulcerosa Patienten, kMC = entzündetes Kolon-Gewebe von Morbus Crohn Patienten

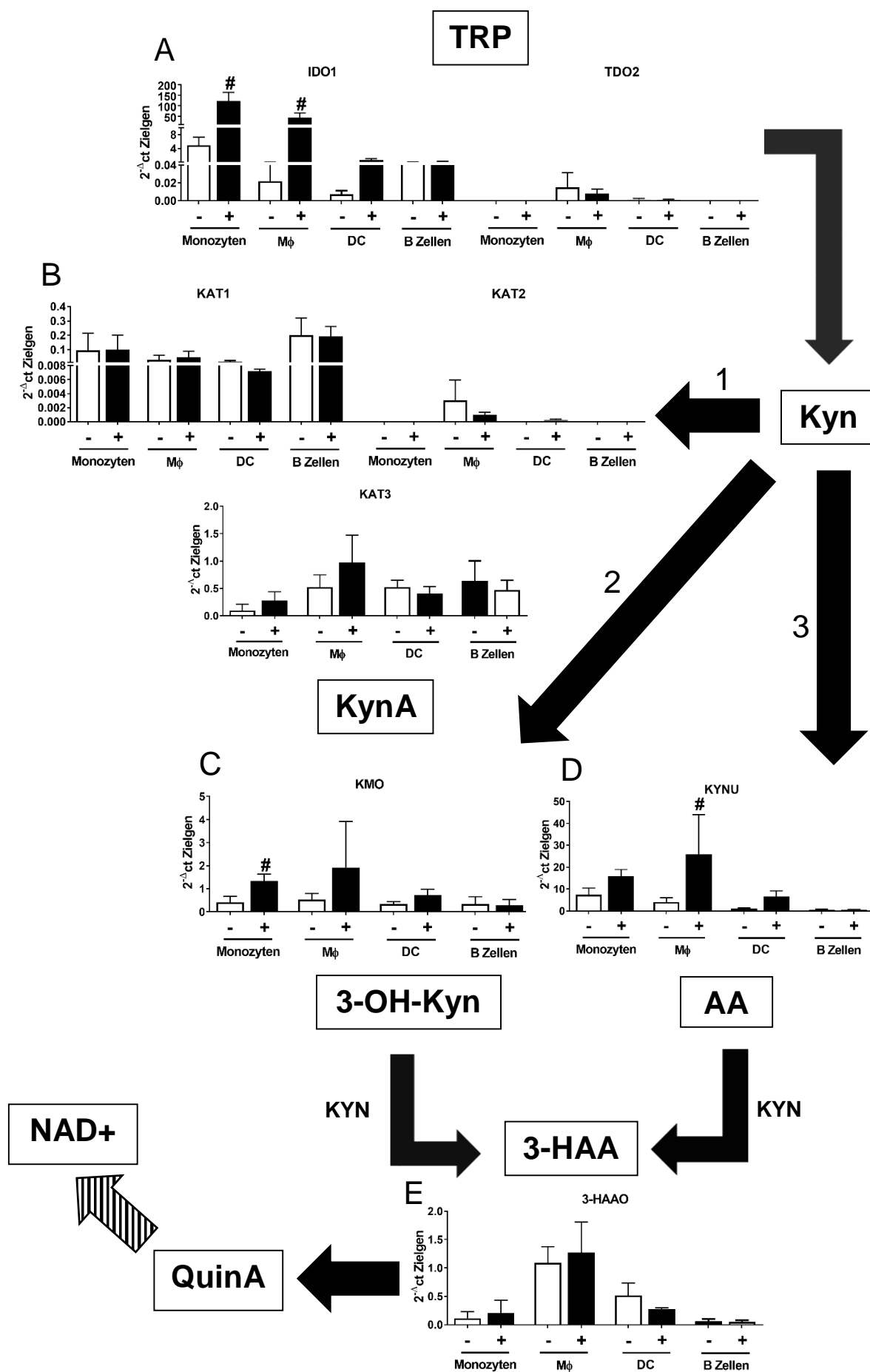
#### **4.4 Entzündungsinduziertes Einzelzellscreening der Tryptophanstoffwechselenzyme und Tryptophanmetabolite in Zelltypen des Immunsystems und des intestinalen Epitheliums**

Die in Abschnitt 4.3 aufgeführten IHC-Enzymexpressionsanalysen zeigten, dass nicht nur Zelltypen des Immunsystems, sondern auch des Epitheliums Enzyme des TRP-Stoffwechsels exprimieren. Im Folgenden soll eine ausführliche Zuordnung von Enzymen des TRP-Stoffwechsels zu Zelltypen des Immunsystems und Epitheliums vorgenommen werden. Ein besonderer Fokus liegt auf den entzündungsinduzierten Expressionen von IDO1 und KYNU welche in den vorherigen Abschnitten als mukosale Biomarker zur Differenzierung von CED-Subtypen identifiziert wurden. Ziel war es zusammen mit den Ergebnissen aus den IHC-Analysen der Gewebeproben von CED-Patienten aus Abschnitt 4.3 aufzuzeigen, ob die beteiligten Enzyme mittels Immunzellinfiltrationen in die Inflammation hineingetragen werden, oder ob die entzündungsinduzierte Regulation der Enzyme des TRP-Stoffwechsels von epithelialer Seite aus gesteuert wird. Dieser zweite Teil der hier zugrundeliegenden Arbeit fokussiert sich bewusst auf eine Einzelzellanalyse von Blut- und Epithelzellen, da diese die eindeutige Stimulation mit Zytokinen erlauben, die auch am Verlauf der CED-Erkrankungen beteiligt sind. Im Weiteren sollen die *in vitro* Daten des mRNA-basierten Screenings Aufschluss über die Induktion der am TRP-Stoffwechsel beteiligten Enzyme und damit den direkten Einfluss entzündlicher Zytokine geben. Im Gesamtkonzept soll somit der Einfluss einer Inflammation, auf mRNA, wie auch auf Proteinebene dargestellt werden. Zur Induktion der Inflammation wurde mit einem Inflammationscocktail stimuliert, welcher aus den proinflammatorischen Zytokinen IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  besteht und die CED-spezifischen Konditionen moduliert. Auf die Darstellung des Screenings von T Zellen ist verzichtet worden, da keine mRNA Expressionen von IDO1 und KYNU detektierbar war.

##### **4.4.1 Antigenpräsentierende Zellen**

Abbildung 15 zeigt das entzündungsinduzierte qRT-PCR-basierte Screening von Enzymen des gesamten TRP-Stoffwechsels in APCs. Wie auch schon in den IHC-Analysen, sollte mit der Detektion des TRP-abbauenden Enzymes IDO1 begonnen werden, welches das ratenlimitierende Enzym im TRP-Stoffwechsel ist. Besonders in

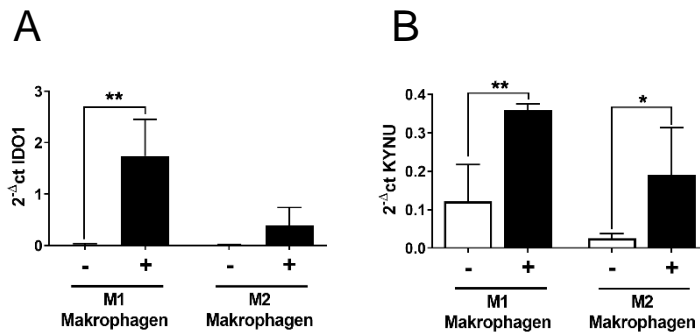
Monozyten und Makrophagen fand ein entzündungsinduzierter Anstieg der IDO1 mRNA Expression statt (Abbildung 15A). Dagegen zeigten DCs und B Zellen keine signifikante Regulation der IDO1 mRNA Expression. TDO2 als zweites TRP-abbauendes Enzym zeigte ebenfalls keine signifikanten Veränderungen im mRNA Expressionsprofil unter Einfluss der proinflammatorischen Zytokine. Lediglich Makrophagen und DCs wiesen eine basale mRNA Expression von TDO2 auf (Abbildung 15 A). Neben der Analyse der Kynurenin aufbauenden Enzyme IDO1 und TDO2, lag der Fokus in der Analyse von Kynurenin-abbauenden Enzymen. Dabei handelt es sich um die Kynureninaminotransferasen (KAT1 – KAT3) mit dem Produkt KynA, KMO mit dem Produkt 3-OH-Kyn sowie KYNU mit den Produkten AA und 3-HAA. Bei der Analyse der mRNA Expressionen der KATs war keine Regulation zu beobachten (Abbildung 15B). Alle APCs exprimierten KAT1 und KAT3 mRNAs, während eine KAT2 mRNA Expression lediglich in Makrophagen und DCs zu detektieren war. Eine signifikante Regulation der KMO mRNA Expression fand nur in Monozyten statt (Abbildung 15C). In Makrophagen, DCs und B Zellen lag keine erhöhte KMO mRNA Expression nach Stimulation vor, wobei alle Zelltypen eine basale KMO mRNA Expression aufwiesen. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass eine signifikant erhöhte mRNA Expression von KYNU in Makrophagen vorlag (Abbildung 15D). Der Anstieg der entzündungsinduzierten KYNU mRNA Expression war spezifisch Makrophagen zuzuordnen. Als letzte Analyse im qRTPCR-basierten Screening sollte der Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen auf das 3-Hydroxyanthranilat-3,4-Dioxygenase (3-HAAO) mRNA Expressionsniveau untersucht werden. Wie schon bei der Analyse der KATs, fand auch bei der Analyse der 3-HAAO mRNA Expression keine Regulation in APCs statt (Abbildung 15E). Zusammenfassend waren besonders Makrophagen von entzündungsinduzierten Veränderungen im Enzymexpressionsprofil des TRP-Stoffwechsels betroffen. IDO1 und KYNU zeigten ein spezifisch erhöhtes mRNA Expressionsprofil, sodass im nächsten Abschnitt näher auf die entzündungsinduzierten Veränderungen der mRNA Expressionen dieser beiden Enzyme in M1 und M2 polarisierten Makrophagen eingegangen werden soll.



**Abbildung 15: Analyse der entzündungsinduzierten mRNA Enzymexpressionen des TRP Stoffwechsels in Antigenpräsentierenden Zellen mittels qRT-PCR.** Die Aussaat von  $1 \times 10^6$  Monozyten, Makrophagen (M $\phi$ ), Dendritische Zellen (DC) und B Zellen sowie die anschließende Stimulation erfolgten für 24 Std. mit IFN $\gamma$  (100 U/ml), TNF $\alpha$  (100 ng/ml) und IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) stimuliert. Die Analyse der mRNA fand nach RNA Extraktion und cDNA-Synthese mittels TaqMan Real Time PCR statt. IDO1 und TDO2 als ratenlimitierende Enzyme verstoffwechseln die essenzielle Aminosäure TRP zum ersten Metaboliten im TRP-Stoffwechsel Kyn. Kyn wiederum kann durch drei Enzymklassen weiter abgebaut werden. 1. durch Kynureninaminotransferasen zu KynA, 2. mittels KMO zu 3-OH-Kyn und 3. mittels KYNU zu AA. 3-OH-Kyn und AA werden final über 3-HAA und QuinA zu NAD $^+$  metabolisiert. **(A)** IDO1 und TDO2, **(B)** KAT1 - KAT 3 **(C)** KMO, **(D)** KYNU und **(E)** 3-HAAO mRNA Expressionen ( $\Delta$ ct) dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD von n = 3. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem paired students t-test. # < 0,05; - = unstimuliert, + = stimuliert, 3-HAA = 3-Hydroxyanthranilsäure, 3-HAAO = 3-Hydroxyanthranilat-3,4-Dioxygenase, 3-OH-Kyn = 3-Hydroxykynurenin, AA = Anthranilsäure, IDO1 = Indolamin-2,3-Dioxygenase 1, IDO2 = Indolamin-2,3-Dioxygenase 2, KAT = Kynureninaminotransferasen, Kyn = Kynurenin, KynA = Kynureninsäure, KYNU = Kynureninase, KMO = Kynurenin-3-Monooxygenase, NAD $^+$  = Nicotinadenindinukleotid, QuinA = Quinolinsäure

#### 4.4.2 M1 und M2 Makrophagen

Da spezifisch Makrophagen entzündungsinduzierte IDO1 und KYNU mRNA Regulationen aufwiesen (siehe Abschnitt 4.4.1), sollten nun zwei Subpopulationen dieses Zelltyps näher untersucht werden. Die M1 Subpopulation stellt hierbei den proinflammatorischen Zelltyp, während die M2 Subpopulation den antiinflammatorischen Zelltyp darstellt. In M1 Makrophagen war zu beobachten, dass die IDO1 und KYNU mRNA Expressionen signifikant reguliert waren (Abbildung 16A und 16B). Für beide Enzyme stieg die mRNA Produktion an und lag vergleichsweise über der Produktion von IDO1 und KYNU in M2 Makrophagen. Interessanterweise ähnelte die mRNA Expression von IDO1 und KYNU dem Enzymexpressionsprofil, das in den IHC-Analysen der iMC Gewebeproben in Abschnitt 4.3.3 nachzuweisen war. M2 Makrophagen zeigten dagegen lediglich eine Regulation der KYNU mRNA, jedoch keine Regulation der IDO1 mRNA (Abbildung 16A und 16B). Im nächsten Abschnitt soll in Anlehnung an die Ergebnisse des Abschnitts 4.3.4 und somit dem erhöhten Niveau an 3-HAA in iMC Gewebeproben untersucht werden, ob Makrophagen die Hauptproduzenten von 3-HAA sind.

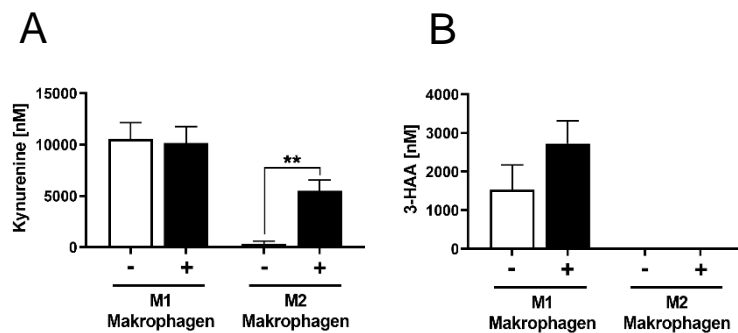


**Abbildung 16: Analyse der entzündungsinduzierten IDO1 und KYNU mRNA Expressionen in M1 und M2 Makrophagen mittels qRT-PCR.** Die Aussaat von  $10^6$  M1 und M2 Makrophagen und anschließende Stimulation erfolgte für 24 Std. mit  $\text{IFN}\gamma$  (100 U/ml),  $\text{TNF}\alpha$  (100 ng/ml) und IL-1 $\beta$  (10 ng/ml). Die Analyse der mRNA nach RNA Extraktion und cDNA-Synthese mittels TaqMan Real Time PCR statt. (A) IDO1 und (B) KYNU mRNA Expressionen ( $\Delta\text{ct}$ ) dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD von  $n = 3 - 5$ . Die statistische Auswertung erfolgte mit dem paired students t-test. \*  $< 0,05$ ; - = unstimuliert, + = stimuliert, IDO1 = Indolamin-2,3-Dioxygenase 1, KYNU = Kynureninase, KMO = Kynurenin-3-Monooxygenase

#### 4.4.3 Einzelzellanalyse der entzündungsinduzierten Produktion von Kynurenin und 3-Hydroxyanthranilsäure durch M1 und M2 Makrophagen

Die Einzelzellscreenings in den Abschnitten 4.4.1 und 4.4.2 zeigten, dass eine entzündungsinduzierte KYNU Regulation lediglich in Makrophagen möglich ist. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den Abschnitten 4.3.3 und 4.3.4 sowie den darin enthaltenen Erkenntnissen, dass in Gewebeproben von iMC Patienten sowohl KYNU überexprimiert als auch ein signifikant erhöhtes Niveau an 3-HAA vorhanden war, sollte nun final gezeigt werden, dass Makrophagen die Hauptproduzenten von 3-HAA sind. Sowohl M1 als auch M2 Makrophagen produzierten Kynurenin (Abbildung 17A). In den Überständen von M1 Makrophagen zeigten sich höhere Konzentrationen von Kynurenin als dies in Überständen von M2 Makrophagen zu beobachten war. Lediglich Überstände von M1 Makrophagen wiesen ein detekierbares 3-HAA Signal auf (Abbildung 17B). Somit bestätigte sich die Hypothese, dass Makrophagen, speziell M1 Makrophagen, Hauptproduzenten von 3-HAA sind. Weder in weiteren Subpopulationen von APCs und T Zellen noch in den epithelialen Zelllinien war ein Signal für 3-HAA zu detektieren (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend verdeutlichten die qRT-PCR-basierten Screenings, dass sowohl eine

entzündungsinduzierte KYNÜ Überexpression, als auch eine erhöhte Produktion von 3-HAA spezifisch Makrophagen zuzuordnen war.



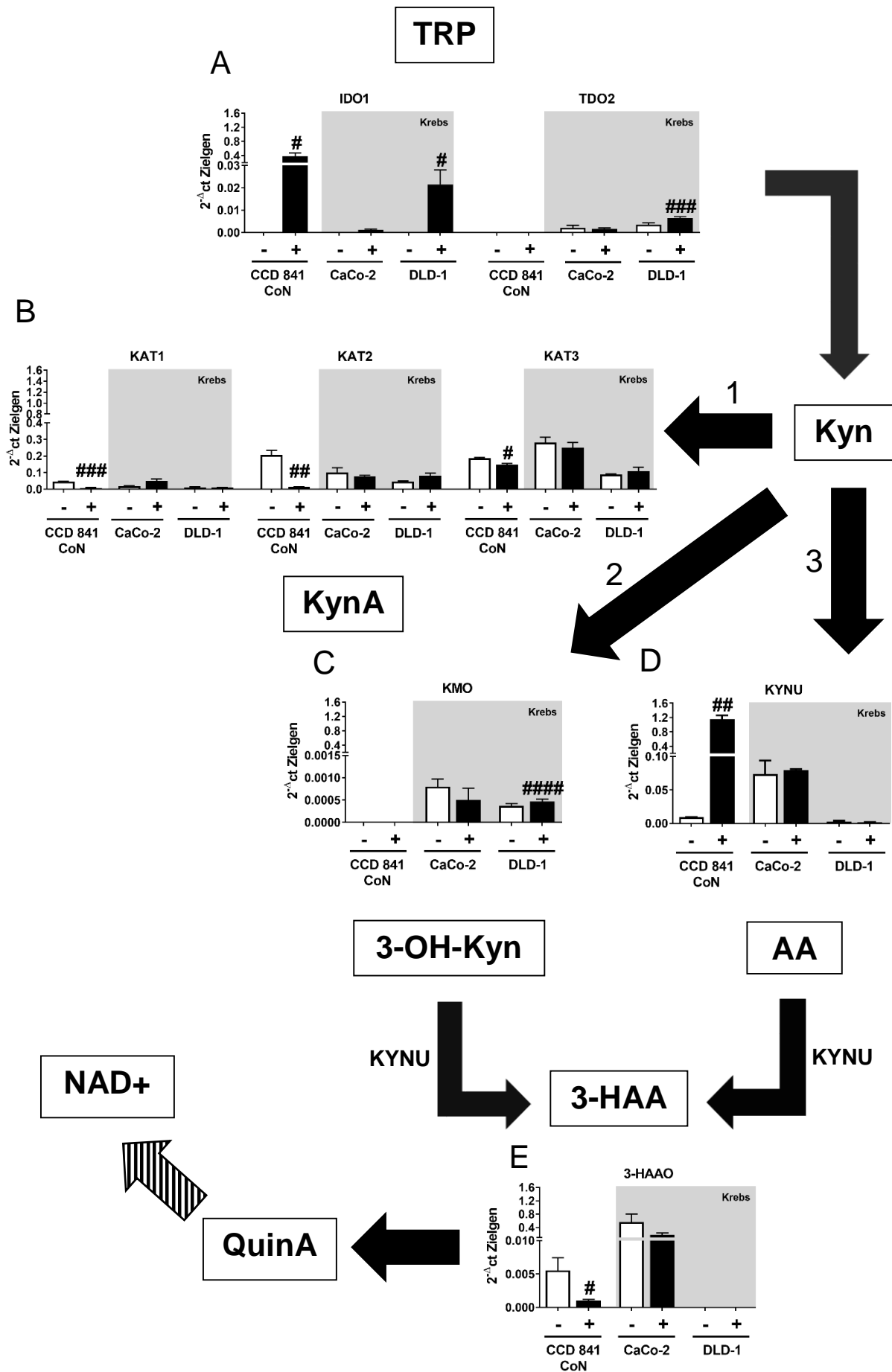
**Abbildung 17: Entzündungsinduzierte Kynurenin und 3-HAA Produktion durch M1 und M2 Makrophagen via LC-MS/MS.** Die Aussaat von  $10^6$  M1 und M2 Makrophagen sowie die anschließende Stimulation erfolgte für 24 Std. mit IFN $\gamma$  (100 U/ml), TNF $\alpha$  (100 ng/ml) und IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) stimuliert. Nach dem Sammeln der Überstände erfolgte die Detektion von Kynurenin und 3-HAA mittels LC-MS/MS. **(A)** Kynurenin und **(B)** 3-HAA Konzentrationen in Zellkulturüberständen dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD von  $n = 3$ . Die statistische Auswertung erfolgte mit dem paired students t-test. \*  $< 0,05$ , \*\*  $< 0,01$ ; - = unstimuliert, + = stimuliert, 3-HAA = 3-Hydroxyanthranilsäure, 3-OH-Kyn = 3-Hydroxykynurenin

#### 4.4.4 Intestinale Epithelzellen

Neben Veränderungen im entzündungsinduzierten TRP-Enzymexpressionsprofil in APCs sollte zusätzlich der Einfluss einer Inflammation auf intestinale Epithelzellen untersucht und somit die Bedingungen einer CED-Erkrankung anhand von *in vitro* Versuchen modelliert werden. Gleichzeitig sollte die Auswirkung einer Kanzerogenese in die Analysen miteinbezogen werden, um so eine inflammations-induzierende (*inflammation-induced*) Krebserkrankung zu untersuchen. Abbildung 18 zeigt das qRTPCR-basierte Screening aller am TRP-Stoffwechsel beteiligter Enzyme unter Einfluss proinflammatorischer Zytokine in epithelialen Zellen. Der Versuchsaufbau beinhaltet den Vergleich der intestinalen Epithelzelllinie CCD 841 CoN mit den beiden intestinalen Krebszelllinien CaCo-2 und DLD-1. Lediglich in CCD 841 CoN und in DLD-1 Zellen stieg die IDO1 mRNA nach Stimulation an (Abbildung 18A). Die IDO1 mRNA Expression in CaCo-2 Zellen blieb dagegen unverändert. Generell wiesen CaCo-2 Zellen ein sehr geringes IDO1 mRNA Niveau auf. Die TDO2 mRNA Expression war spezifisch den beiden Krebszelllinien CaCo-2 und DLD-1 zuzuordnen, wohingegen in



CCD 841 CoN Zellen kein TDO2 mRNA Signal detektierbar war (Abbildung 18A). In DLD-1 Zellen fand sogar eine signifikante Induktion der TDO2 mRNA Expression nach Stimulation statt. Lediglich die Epithelzelllinie CCD 841 CoN wies eine Veränderung im mRNA Expressionsprofil der KATs auf (Abbildung 18B). Der Einfluss der proinflammatorischen Zytokine induzierte eine Verminderung im mRNA Enzymexpressionsprofil von KAT1, KAT2 und KAT3. Trotzdem zeigten auch die Krebszelllinien CaCo-2 und DLD-1 eine basale mRNA Expression von KAT1, KAT2 und KAT3. Wie auch schon für TDO2, war eine KMO mRNA Expression lediglich in CaCo-2 und DLD-1 Zellen identifizierbar und somit spezifisch den beiden intestinalen Krebszelllinien zuzuordnen (Abbildung 18C). Parallel zu den IHC-Analysen im Abschnitt 4.3, sowie den qRTPCR-basierten Screenings der Enzymexpressionen des TRP-Stoffwechsels in APCs, lag auch in den epithelialen Zellen ein besonderer Fokus auf der entzündungsinduzierten Analyse von KYNU. In der intestinalen Epithelzelllinie CCD 841 CoN zeigte KYNU eine signifikant erhöhte mRNA Expression nach Induktion mit dem proinflammatorischen Stimulus (Abbildung 18D). Auffallend war, dass beide intestinale Krebszelllinien versuchten, ein konstant niedriges mRNA Niveau von KYNU zu halten, welches nicht regulierbar war. Entsprechend wies das 3-HAA abbauende Enzym 3-HAAO kein mRNA Signal in DLD-1 Zellen auf (Abbildung 18E). Im Vergleich dazu lag in CaCo-2 Zellen ein hohes mRNA Niveau von 3-HAAO vor, welches jedoch nicht regulierbar war. CCD 841 Zellen zeigten wiederum eine Regulation der 3-HAAO mRNA. Nach Stimulation verminderte sich das 3-HAAO mRNA Niveau. Zusammenfassend ließen sich interessante Erkenntnisse aus den mRNA basierten Analysen des TRP-Stoffwechsels in intestinalen Epithelzellen ziehen. TDO2 und KMO mRNA Expressionen sind spezifisch den beiden Krebszelllinien zuzuordnen. Auf die zu Anfang gestellte Frage, ob auch intestinale Epithelzellen IDO1 und KYNU exprimieren könnten, kann somit ein klares Fazit gezogen werden. Sowohl IDO1 und KYNU mRNA sind von intestinalen Epithelzellen exprimierbar, als auch entzündungsinduziert regulierbar. Besonders interessant ist jedoch die unterschiedliche Enzymexpression der KYNU zwischen den normalen intestinalen Zelllinien und den intestinalen Krebszelllinien. Im nächsten Abschnitt soll deshalb abschließend zum qRTPCR-basierten Screening die Produktion von immunsuppressiven und pro-karzinogenen Kynurenin durch die epithelialen Zellen untersucht werden.



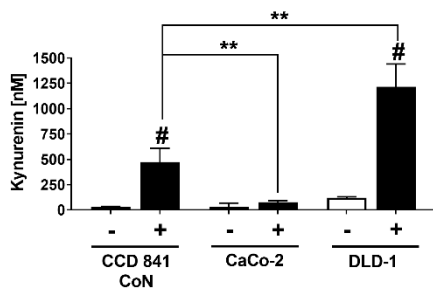
**Abbildung 18: Analyse der entzündungsinduzierten mRNA Enzymexpressionen des TRP-Stoffwechsels in intestinalen Epithelzellen mittels qRT-PCR.** Die Aussaat von 500.000 CCD 841 CoN, CaCo-2 und DLD-1 Zellen sowie die anschließende Stimulation erfolgte für 24 Std. mit IFN $\gamma$  (100 U/ml), TNF $\alpha$  (100 ng/ml) und IL-1 $\beta$  (10 ng/ml). Die Analyse der mRNA fand nach RNA Extraktion und cDNA-Synthese mittels TaqMan Real Time PCR statt. IDO1 und TDO2 als ratenlimitierende Enzyme verstoffwechseln die essenzielle Aminosäure TRP zum ersten Metaboliten im TRP-Stoffwechsel Kyn. Kyn wiederum kann durch drei Enzymklassen weiter verstoffwechselt werden. 1. durch Kynureninaminotransferasen zu KynA, 2. mittels KMO zu 3-OH-Kyn und 3. mittels KYNU zu AA. 3-OH-Kyn und AA werden final über 3-HAA und QuinA zu NAD $^{+}$  verstoffwechselt. **(A)** IDO1 und TDO2, **(B)** KAT1 – KAT 3 **(C)** KMO, **(D)** KYNU und 3-HAAO mRNA Expressionen ( $\Delta$ ct) dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD von n = 3. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem paired students t-test. # < 0,05, ## < 0,01, ### < 0,001, #### < 0,0001; - = unstimuliert, + = stimuliert, 3-HAA = 3-Hydroxyanthranilsäure, 3-HAAO = 3-Hydroxyanthranilat-3,4-Dioxygenase, 3-OH-Kyn = 3-Hydroxykynurenin, AA = Anthranilsäure, IDO1 = Indolamin-2,3-Dioxygenase 1, IDO2 = Indolamin-2,3-Dioxygenase 2, KAT = Kynureninaminotransferasen, Kyn = Kynurenin, KynA = Kynureninsäure, KYNU = Kynureninase, KMO = Kynurenin-3-Monooxygenase, NAD $^{+}$  = Nicotinadenindinukleotid, QuinA = Quinolinsäure

#### 4.4.5 Einzelzellanalyse der entzündungsinduzierten Produktion von Kynurenin durch intestinale Epithelzellen

Da erhöhte IDO1 und TDO2 Enzymexpressionen nicht mit einer erhöhten Enzymfunktion und somit der Produktion von Kynurenin gleichbedeutend sind, sollte zusätzlich die Kynurenin Konzentration in Zellkulturüberständen von entzündungsinduzierten CCD 841 CoN, CaCo-2 und DLD-1 Zellen bestimmt werden. Die Ergebnisse in Abschnitt 4.4.4 zeigten, dass sowohl eine IDO1 mRNA Expression, als auch eine KYNU mRNA Expression in epithelialen Zellen detektierbar war, wodurch der Hinweis auf eine potentielle Produktion von Kynurenin gegeben ist. Abbildung 19A zeigt die Produktion von Kynurenin in Zellkulturüberständen der Zelllinien CCD 841 CoN, CaCo-2 und DLD-1. Während die basalen Kynurenin Konzentration in allen Zelllinien gering ausfiel, zeigten CCD 841 CoN und DLD-1 Zellen einen signifikant entzündungsinduzierten Anstieg der Kynurenin Produktion. CaCo-2 Zellen dagegen wiesen keine signifikanten Änderungen im Kynurenin Niveau auf. Besonders interessant ist der Vergleich zwischen der entzündungsinduzierten Kynurenin Produktion in der epithelialen Zelllinie CCD 841 CoN und der entzündungsinduzierten Kynurenin Produktion in den Krebszelllinien CaCo-2 und

DLD-1. Hierbei ist zu sehen, dass DLD-1 Zellen eine deutlich höhere Konzentration an Kynurenin produzieren als dies in CCD 841 CoN Zellen zu beobachten war. CaCo-2 Zellen zeigten dagegen ein signifikant niedrigeres Niveau an Kynurenin. Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass eine Inflammation im normalen Epithel einen Anstieg im Kynurenin Niveau hervorruft. Ein Ausbleiben der Produktion von Kynurenin, sowie eine übermäßige Produktion ist dagegen intestinalen Krebszellen zuzuordnen.

A

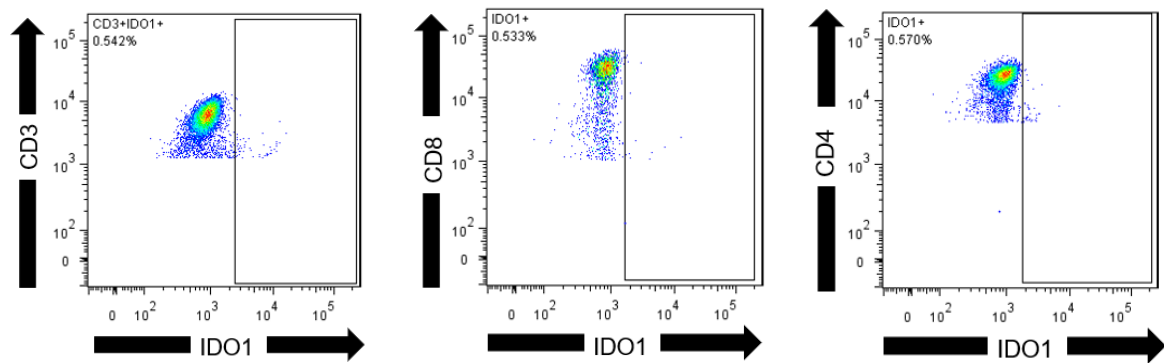


**Abbildung 19: Entzündungsinduzierte Kynurenin Produktion durch die intestinalen Zelllinien CCD 841 CoN, CaCo-2 und DLD-1 via LC-MS/MS.** Die Aussaat von 500.000 CCD 841 CoN, CaCo-2 und DLD-1 Zellen sowie anschließende Stimulation erfolgte für 24 Std. mit IFN $\gamma$  (100 U/ml), TNF $\alpha$  (100 ng/ml) und IL-1 $\beta$  (10 ng/ml). Nach Sammlung der Überstände fand die Detektion von Kynurenin mittels LC-MS/MS statt. (A) Kynurenin in Zellkulturüberständen dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD von n = 3. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem paired students t-test. # = verglichen zur unstimulierten Kontrolle, # < 0,05; \* = verglichen wie angegeben, \* < 0,05, \*\* < 0,01; - = unstimuliert, + = stimuliert

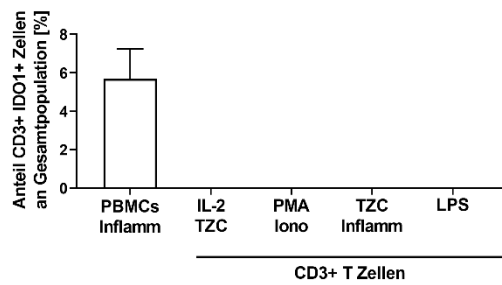
#### **4.5 Nachweis der Indolamin-2,3-Dioxygenase 1 Proteinexpression in systemischen und lokalen T Zellen**

Da innerhalb des mRNA-basierten Screenings von Enzymen des TRP-Stoffwechsels in T Zellen keine IDO1 Expression nachzuweisen war, sollte dies nochmals auf Proteinebene bestätigt werden. Hierfür sollten sowohl systemische T Zellen aus dem Blut, als auch gewebständige lokale T Zellen untersucht werden. In diesem Versuch sollte die Frage beantwortet werden, ob T Zellen in der Lage sind TRP abzubauen, sowie Kynurenin mittels IDO1 Expression zu produzieren. In den Abbildungen 19A und 19B sind die FACS Analysen des Nachweises von IDO1 in T Zellen dargestellt. Weder in CD3+, noch in den Subpopulationen von CD4+ und CD8+ T Zellen war ein Signal für IDO1 nachzuweisen (Abbildung 19A). Auch der Einfluss diverser Stimulanzen zeigte keinen Effekt auf die IDO1 Proteinexpression in T Zellen (Abbildung 19B). Somit ist auszuschließen, dass systemische T Zellen IDO1 exprimieren. Mittels Immunfluoreszenz sollte im Weiteren eine Kolo-kalisation von IDO und CD8 in Gewebeproben von CED-Patienten und Colitis-assoziierten-Krebspatienten (CAC) gezeigt werden. Zwar wiesen alle Gewebeproben sowohl ein Signal für eine IDO1-Expression (grün) als auch eine CD8-Expression (rot) auf, jedoch waren in den Gewebeproben keine doppelt positiven Zellen (gelb) aufzufinden (Abbildungen 19C und 19D). Letztendlich ist somit auch in lokalen gewebständigen T Zellen eine Proteinexpression von IDO1 auszuschließen. Zusammenfassend zeigen die hier dargestellten Daten, dass T Zellen keine IDO1 exprimieren. Dies war unabhängig vom Krankheitstyp (chronisch entzündliche Erkrankungen, Krebs) zu beobachten. Mit den Ergebnissen der Analyse von TRP-Metaboliten in Zellkulturüberständen aus Abschnitt 4.4.3 ist auszuschließen, dass T Zellen dazu befähigt sind Kynurenin und weitere Metabolite von TRP zu bilden. Letztendlich bestätigt dies die Hypothese, dass APCs als Produzenten von TRP-Metaboliten fungieren, währenddessen T Zellen mit ihren diversen in der Literatur beschriebenen Zielstrukturen als Konsumenten fungieren. Dass diese Zielgene entzündungsinduziert spezifisch in T Zellen reguliert sind, soll der nachfolgende Abschnitt klären.

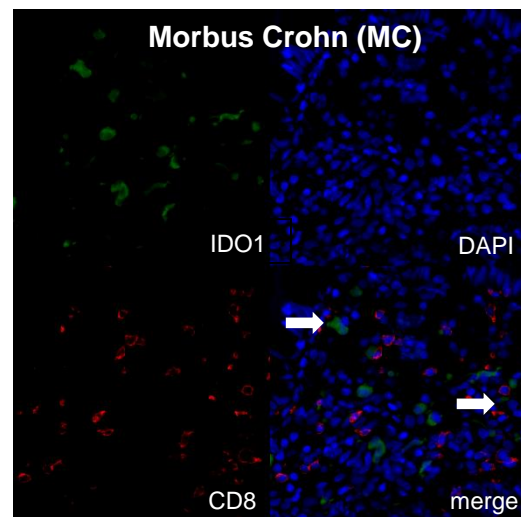
A



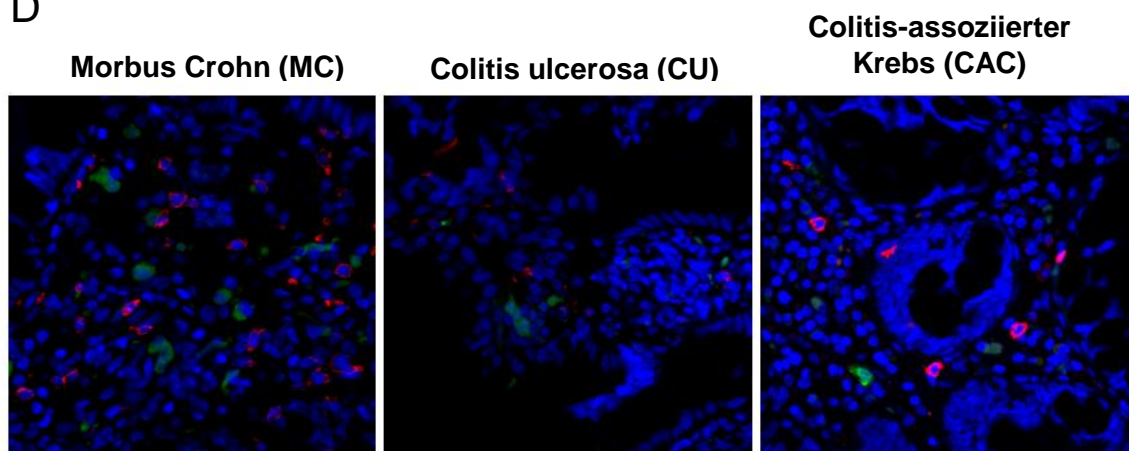
B



C



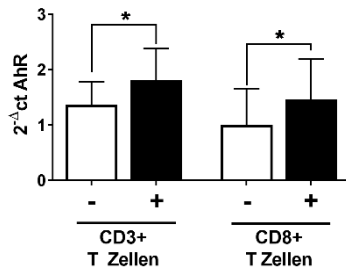
D



**Abbildung 20: Analyse der systemischen und lokalen IDO1 Proteinexpression in T Zellen mittels FACS und Immunfluoreszenz.** (A) FACS Analyse zur Identifikation IDO1+ T Zellen. Die FACS Analysen beinhalten die Aufreinigung von *Buffy Coats* mittels Dichtegradientenzentrifugation zur Isolation von PBMCs. Die Stimulation der PBMCs erfolgte für 24 Std. mit IL-2 (1 µg/ml) + TZC (5 µl/1 ml), PMA (20 nM) + Iono (1 µM), Inflamm + TZC (5 µl/1 ml) oder LPS (1 µg/ml) stimuliert. (B) Graphische Auswertung zur Analyse IDO1+ T Zellen mittels FACS Analysen. Als Positivkontrolle diente die entzündungsinduzierte IDO1 Expression von APCs. (C, D) Nachweis IDO1+ DP T Zellen mittels Immunfluoreszenz in FFPE Gewebeproben von MC, CU und CAC Patienten (repräsentativ, 20x). Graphen dargestellt als Mittelwert +/- SD von n = 5. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test. APC = Antigenpräsentierende Zellen, CAC = Colitis-assoziiierter Krebs, CU = Colitis ulcerosa, DAPI = 4',6-Diamididin-2-phenylindol, FACS = *fluorescence-activated cell sorting*, FFPE = Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet, IDO1 = Indolamin-2,3-Dioxygenase 1, Inflamm = Inflammationscocktail (100 U/ml IFN $\gamma$ , 100 ng/ml TNF $\alpha$ , 10 ng/ml IL-1 $\beta$ ), Iono = Ionomycin, LPS = Lipopolysaccharid, MC = Morbus Crohn, PBMCs = *Peripheral blood mononuclear cells*, PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat, TZC = T Zell Cocktail

#### 4.6 Analyse der entzündungsinduzierten Regulation des potenziellen Zielgenes von Kynurenin dem Arylhydrocarbonrezeptor

Ein essenzielles Zielgen von TRP-Metaboliten ist der Arylhydrocarbonrezeptor (AhR). Um abschließend in einem letzten Versuch den Einfluss der entzündungsinduzierten Regulation dieses Zielgenes zu untersuchen, sollten parallel zu den in Abschnitt 4.4 durchgeführten Enzymexpressionsanalysen, qRTPCR-basierte Screenings von AhR vorgenommen werden. Entgegen der Erkenntnisse, dass T Zellen keine TRP-abbauende Enzyme exprimieren, zeigten CD3+ als auch CD8+ T Zellen eine signifikante Induktion der AhR mRNA Expression nach Stimulation mit den entzündungsinduzierenden Stimuli (Abbildung 21A). Dieser Effekt war nicht in APCs und den intestinalen Epithelzellen nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Somit war die entzündungsinduzierte Regulation der AhR mRNA Expression spezifisch T Zellen zuzuordnen. Abschließend zeigten die Ergebnisse, dass APCs, besonders Makrophagen, sowie Epithelzellen, Enzyme des TRP-Stoffwechsels exprimieren und somit TRP-Metabolite produzieren. T Zellen, mittels dem Zielgen AhR dagegen, fungieren als potenzielle Konsumenten von TRP-Metaboliten.



**Abbildung 21: Entzündungsinduzierte mRNA Expression von AhR in T Zellen.** Die Aussaat von  $10^6$  CD3+ und CD8+ T Zellen erfolgte für 24 Std. mit  $\text{IFN}\gamma$  (100 U/ml),  $\text{TNF}\alpha$  (100 ng/ml) und IL-1 $\beta$  (10 ng/ml). Die Analyse der mRNA fand nach RNA Extraktion und cDNA-Synthese mittels TaqMan Real Time PCR statt. AhR mRNA Expression ( $\Delta ct$ ) dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD von  $n = 3 - 5$ . Die statistische Auswertung erfolgte mit dem paired students t-test. \*  $< 0,05$ , \*\*  $< 0,01$ ; - = unstimuliert, + = stimuliert, AhR = Arylhydrocarbonrezeptor



## 5. Diskussion

Die Ätiopathogenese von CED und den beiden Hauptvertretern Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, ist zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht geklärt. Dies bedeutet für den Patienten, dass zwar eine Behandlung der Symptome vorgenommen werden kann, eine Heilung jedoch nur bis zu einem gewissen Grad möglich ist. Somit handelt es sich bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa um lebenslange, chronisch-entzündliche Erkrankungen, bei denen trotz verstärkter therapeutischer Bemühungen der letzten Jahre, lediglich eine Langzeit-Remission durch die Heilung der Mukosa erreicht werden kann [51,184]. Essentiell für die Wahl eines geeigneten Therapieverfahrens ist eine exakte Diagnosestellung. Endoskopische, klinische, histologische und laborbasierte Testverfahren helfen zwar bei der Charakterisierung des Phänotyps, trotzdem treten immer wieder Fälle auf, die eine exakte Zuordnung zu den CED-Subtypen Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa nicht zulassen. Hilfreich hierfür sind Biomarker. Vielversprechend sind erste Ergebnisse zum TRP-Stoffwechsel bei Autoimmunerkrankungen, besonders bei CED. Hierbei wurden verminderte systemische TRP-Konzentrationen bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa Patienten beobachtet [178]. Ziel dieser Arbeit war es mit Hilfe der Analyse von Enzymen und Metaboliten des TRP-Stoffwechsels einen Biomarker zu identifizieren, der eine eindeutige Differenzierung von CED-Subtypen gewährleistet.

In der überwiegenden Anzahl an Studien zum TRP-Stoffwechsel befassten sich die Autoren ausschließlich mit der Produktion und Funktion des ersten TRP-Metaboliten Kynurenin sowie mit den TRP-abbauenden und Kynurenin-erzeugenden Enzymen IDO1 und TDO. Vernachlässigt wurden jedoch Enzyme und Metabolite, welche am Abbau von Kynurenin beteiligt sind. Innerhalb dieser Arbeit nahm die Analyse des Kynurenin-abbauenden Enzyms KYNU eine entscheidende Rolle ein. Neben LC-MS/MS und ELISA Analysen zur Detektion von TRP-Metaboliten trugen IHC-Analysen zur Vervollständigung der Untersuchungen in humanen Ileum- und Kolongewebe bei. Hierbei waren der Expressionsstatus der Enzyme IDO1, KYNU und KMO sowie die Lokalisation der Darmentzündung im Verlauf des Interstitiums vom Ileum bis zum Rektum entscheidend. Zusammenfassend identifizierte diese Arbeit eine Biomarker-Signatur zur eindeutigen Differenzierung der CED-Subtypen Ileum-assoziiierter Morbus Crohn (iMC), Kolon-assoziiierter Morbus Crohn (kMC) und Kolon-assoziierte Colitis ulcerosa (kCU). Die abschließenden *in vitro* Experimente der epithelialen

Krebszelllinien eröffneten zusätzlich eine neue Betrachtungsweise der Rolle von KYNU bei Krebserkrankungen. Während bei normalen intestinalen Epithelzellen die mRNA Expressionsniveaus von IDO1 und KYNU im Rahmen einer entzündlichen Stimulation anstiegen, zeigten epitheliale Krebszelllinien keine Regulation der KYNU. Die geringe basale und nicht regulierbare KYNU mRNA Expression spiegelte sich auch im Kynureninniveau wieder, da in DLD-1 Zellkulturüberständen hohe Kynureninkonzentrationen detektierbar waren. Diese grundlegende Erkenntnis der übermäßigen Produktion von immunsuppressivem Kynurenin basierend auf einer mangelnden Expression der KYNU, gilt es in zukünftigen Studien zu bestätigen, um hier im Hinblick auf die Karzinogenität einer chronischen Entzündung neue Therapieansätze durch eine gezielte Steuerung von TRP-Metabolitströmen zu entwickeln.

## **5.1 Analyse des systemischen Tryptophanstoffwechsels**

### **5.1.1 Tryptophanstoffwechsel bei CED-Patienten in Remission**

Die Analysen der Plasmaproben von TRP-Metaboliten zwischen CED-Patienten und gesunden Probanden zeigten lediglich bei TRP und KynA signifikante Veränderungen (Abbildung 5). Dabei wiesen Morbus Crohn Patienten verminderte TRP-Konzentrationen und Colitis ulcerosa Patienten erhöhte KynA-Konzentrationen auf. Innerhalb der Charakterisierung der CED-Patientenkohorte-Frankfurt muss berücksichtigt werden, dass sich alle Patienten zum Zeitpunkt der Probenentnahme in Remission befanden und keine aktive Darmentzündung zu erwarten war. Dies bestätigten die klinischen und endoskopischen Scores. Ein Vergleich zwischen Patienten im Schub und in Remission, sowie ein Vergleich aktiv erkrankter Morbus Crohn mit aktiv erkrankten Colitis ulcerosa Patienten war nicht möglich. Nach diesen ersten Analysen humaner CED-Proben und der unterschiedlichen Ausprägung der Kolitis in verschiedenen Dünndarm- und Dickdarmabschnitten stellte sich die Frage, inwieweit CED-Subtypen speziell in Bezug auf den TRP-Stoffwechsel zu unterscheiden sind. Aus diesem Grund erfolgte die Anwendung einer Montreal-Klassifizierung und ein Vergleich zwischen den L1 und L2 Subtypen bei Morbus Crohn. Für die weiteren TRP-Metabolite 3-OH-Kyn, AA, 3-HAA und QuinA blieben sowohl beim Vergleich der gesunden Probanden mit CED-Patienten in Remission, als auch

zwischen den L1 und L2 Morbus Crohn Subtypen signifikante Unterschiede in den TRP-Metabolit-Plasmakonzentrationen aus (Abbildung 5). Selbst für TRP und Kynurenin war kein Unterschied zwischen den L1 und L2 Morbus Crohn Subtypen zu detektieren. Interessant sind diese Ergebnisse jedoch für die beobachteten Kynureninkonzentration bei Morbus Crohn Patienten. Trotz des Abfalls von TRP, blieb ein Anstieg der Kynureninkonzentration aus. Somit stellt sich die Frage, wie TRP weiter verstoffwechselt wird und welche Route der Abbau nimmt. Hypothetisch könnte Kynurenin sowohl anteilsweise in KynA, AA als auch 3-OH-Kyn verstoffwechselt werden, eine statistische Signifikanz wird jedoch aufgrund der minimalen Veränderungen nicht erreicht. Zum Nachweis signifikanter Veränderungen dieser Metabolite kommen lediglich hochsensitive Methoden in Frage. In den kooperierenden LC-MS/MS Laboren (P. Weller, HAW Mannheim) lag die untere Grenze der Detektion (*Limit Of Detection*) für TRP, Kynurenine, KynA, 3-OH-Kyn, AA und 3-HAA im mittleren nanomolaren Bereich. TRP Metabolite im picomolaren Bereich, konnten dagegen nicht bestimmt werden.

Im Weiteren stellt sich die Frage, warum TRP überhaupt bei Morbus Crohn Patienten vermindert ist. Hauptinduktoren der IDO1 Expression sowie deren Aktivität sind proinflammatorische Zytokine wie IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  [185]. Patienten in Remission erhalten immunsuppressive Medikationen um die Bildung proinflammatorischer Zytokine zu verhindern [186]. Der Einfluss dieser Zytokine auf eine erhöhte IDO1 Aktivität ist somit außer beim einem Rückfall weniger wahrscheinlich. Dagegen rufen zur Schubbehandlung verwendete Steroide eine Aktivitätssteigerung der TDO hervor, die somit Einfluss auf das systemische TRP-Konzentrationsniveau nehmen und die verminderten TRP-Konzentrationen hervorrufen könnten. Anhand der Literatur wird diese Hypothese bestätigt, da u.a. Badawy et al. schlussfolgerten, dass die hepatische TDO größeren Einfluss auf die systemische TRP-Konzentration nimmt, als die peripher lokalisierte IDO1 Expression, welche den lokalen TRP-Stoffwechsel reguliert [185]. Der Unterschied der TRP und KynA Konzentration von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa Patienten könnte hypothetisch damit zu begründen sein, dass beide Erkrankungen über ein spezifisches Zytokinmuster verfügen. Während Morbus Crohn überwiegend als TH1 assoziierte Erkrankung beschrieben ist, ist Colitis ulcerosa als eher TH2-assozierte Erkrankung dargestellt [61,62]. IDO1 wird in Studien als TH1 induzierbar charakterisiert [185], während in neuronalen Erkrankungen die Induktion von KATs von

TH2 assoziierten Zytokinen beschrieben wird [187,188]. Ähnliche Zuordnungen in der Unterscheidung von MC und CU Patienten bestätigen sich in Analytik-Ergebnissen auch hier (siehe Abbildung 5).

Eine Limitation dieser ersten Studie mit CED-Patienten aus Frankfurt war, dass keine Proben von Patienten im aktiven Schub untersucht werden konnten. Wie schon erwähnt, erfolgt eine Aktivierung des TRP-Stoffwechsels über proinflammatorische Zytokine, wie sie bei aktiv erkrankten CED-Patienten vorzufinden sind. Auch Nikolaus et al. zeigten in ihrer Studie einen Abfall der TRP-Konzentration bei Morbus Crohn Patienten in Remission [178]. Eine Veränderung der TRP-Konzentration von Colitis ulcerosa Patienten in Remission im Vergleich zu Kontrollen wurde in dieser Publikation nicht beschrieben. Somit konnte die qualitative Korrektheit der ELISA und LC-MS/MS Analysen für die in dieser Arbeit verwendeten TRP-Messungen bestätigt werden. Beeindruckend ist, dass die Autoren dieser klinischen Studie keine direkten Veränderungen im Kynurenin Profil von Morbus Crohn Patienten aufzeigten. Innerhalb der Studie wurde lediglich das Verhältnis von Kynurenin zu TRP dargestellt (Kynurenin/TRP). Über die Frage, warum die Kynurenin-Konzentrationen nicht gezeigt werden, kann nur spekuliert werden und stellt in Frage wie valide und glaubwürdig die Messungen sind. Im Weiteren verdeutlicht diese Studie, dass der größte Effekt auf den TRP-Metabolitstrom bei CED-Patienten im Schub zu beobachten war. Die Schlussfolgerung ist, dass eine aktive Entzündung vorliegen muss um signifikante Veränderung im systemischen TRP-Stoffwechsel feststellen zu können. Auf die zu Anfang gestellte Frage, ob sich TRP-Metabolite im Blut zu Charakterisierung von CED-Subtypen und somit zur Identifizierung eines Biomarkers eignen, kann nur bedingt geantwortet werden. Auszuschließen ist jedoch, dass TRP-Metabolite als Biomarker zur Differenzierung von CED-Subtypen in Remission geeignet sind. Da trotzdem der Einfluss einer aktiven intestinalen Entzündung auf den systemischen TRP-Stoffwechsel untersucht werden sollte, diskutiert der nächste Abschnitt die Ergebnisse des murinen DSS Inflammationsmodells.

### 5.1.2 Muriner Tryptophanstoffwechsel

Zur Induktion einer intestinalen Inflammation innerhalb des C57BL/6 Mausmodells erfolgte eine Zugabe von DSS ins Trinkwasser über einen Zeitraum von sechs Tagen.

Die erfolgreiche Induktion der intestinalen Inflammation bestätigen die Ergebnisse des Gewichtsverlustes, der verminderten Kolonlänge sowie der veränderten Stuhlkonsistenz (Abbildung 6). Dabei zeigte die Behandlung mit 2,5 % DSS (starke Inflammation) in Trinkwasser größeren Einfluss als die Gabe von 1,5 % DSS (moderate Inflammation). Die zwei unterschiedlichen DSS Konzentrationen im Trinkwasser erzeugten zwei Schweregrade der Inflammation und ermöglichten somit den Einfluss dieser Parameter auf den systemischen TRP-Stoffwechsel zu untersuchen. Von besonderem Interesse war die Frage, ob DSS sowohl eine Inflammation im Dünndarm als auch im Dickdarm auslöst, oder ob lediglich der Dickdarm betroffen ist. Dass der Dünndarm, spezifisch das terminale Ileum, nicht von einer lokalen Inflammation betroffen war, konnte anhand des Ausbleibens einer verminderten Länge des Dünndarms angedeutet, jedoch nicht eindeutig ausgeschlossen werden. Hierfür wären zusätzliche lokale Untersuchungen des Gewebes nötig gewesen. Dies beinhaltet vor allem die immunhistochemischen Analysen der Infiltration von Immunzellen (u.a. Neutrophile Granulozyten, APCs, Lymphozyten) ins intestinale Gewebe, sowie endoskopische Untersuchungen. Trotzdem ist nicht eindeutig auszuschließen, dass DSS einen Effekt auf den Dünndarm auslöst. Dies gilt es in weiteren Studien eindeutig zu charakterisieren, da besonders bei CED die Lokalisation der Inflammation eine tragende Rolle bei der Wahl der Therapieform sowie bei der Erstellung von Studienprotokollen spielt [79,189,190].

Sowohl die starke, als auch die moderate Inflammation lösten signifikante Veränderungen der systemischen Kynureninspiegel aus (Abbildung 7). Interessant ist, dass die moderate Inflammation die Konzentration von Kynurenin ansteigen ließ, während die starke Inflammation einen Abfall des Kynureninniveaus bewirkte (Abbildung 7A). Dies deutet an, dass bei einer starken Inflammation Enzyme abwärtsgerichtet von IDO1 aktiviert werden und gebildetes Kynurenin direkt weiter verstoffwechselt wird. Die moderate Inflammation löste dagegen einen Anstieg der Kynureninkonzentration aus. Bestätigt wird diese Hypothese durch das systemische 3-HAA Profil. Hierbei war zu beobachten, dass bei der moderaten Inflammation das 3-HAA Niveau unverändert blieb, während bei der starken Inflammation die 3-HAA Konzentrationen signifikant vermindert vorlagen (Abbildung 7B). Es ist anzunehmen, dass nachgeschaltete Enzyme wie KYNU und 3-HAAO durch die starke Inflammation aktiviert werden und anfallendes Kynurenin und 3-HAA weiter verstoffwechselt

werden. Über welche Route Kynurenin und 3-HAA abgebaut werden, kann nur spekuliert werden. Die wahrscheinlichste Theorie ist, dass Kynurenin zu 3-HAA, und 3-HAA zu QuinA verstoffwechselt werden. Sollte auch QuinA einer hohen enzymatischen Umsatzrate unterliegen, wird der Eintritt in den *Salvage-Pathway* und die finale Produktion von NAD<sup>+</sup> eingeleitet [150].

Effektorzellen des Immunsystems (CD8<sup>+</sup> T Zellen, M1 Makrophagen) spielen bei entzündlichen Prozessen eine entscheidende Rolle, da sie zur Produktion von proinflammatorischen Mediatoren beitragen und die Inflammation aufrechterhalten [7]. Durch die Produktion von proinflammatorischen Mediatoren (Zytokine und Chemokine) unterliegen diese Effektorzellen einem anspruchsvollen Energiestoffwechsel und müssen eine hohe Produktion von NAD<sup>+</sup> gewährleisten [117]. Dies konnte auch anhand einer Studie von Minhas et. al gezeigt werden [171]. Makrophagen im proinflammatorischen Mikromilieu wiesen eine hohe Abbaurate von TRP und erhöhte Produktion von NAD<sup>+</sup> auf. Zudem ist aufgefallen, dass die Darmwand der DSS behandelten Mäuse stark verdickt war. Dies ist ein energetisch anspruchsvoller Prozess, welcher von proliferierenden intestinalen Epithelzellen reguliert wird. Auch hier scheint die vermehrte Produktion von NAD<sup>+</sup> über den Abbau von TRP zu Kynurenin und 3-HAA Sinn zu ergeben. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass bei einer moderaten Inflammation das Immunsystem durch die Anhäufung von Kynurenin und dessen immunsuppressiver biologischer Wirkung der Inflammation entgegensteuert um eine überschießende Immunantwort zu verhindern. Die moderate Inflammation spiegelt den physiologisch wertvollen Prozess einer regulierten Aktivierung des Immunsystems wieder. Bei einer starken Inflammation erfolgt ein Wechsel in dieser Regulation und die zwei Seiten des TRP-Stoffwechsels werden offensichtlich. Die Produktion und die Anhäufung von immunsuppressivem Kynurenin wird unterbunden, indem abwärts gerichtete Enzyme des TRP-Stoffwechsels aktiviert werden und energetisch relevantes NAD<sup>+</sup> gebildet wird. Dies spiegelt die zweite, proinflammatorische sowie chronisch-assoziierte Seite des TRP-Stoffwechsel wieder, indem die fördernde Wirkung auf den Immunmetabolismus der Effektorzellen gewährleistet wird.

Limitationen innerhalb dieses Versuches waren, dass lediglich Kynurenin und 3-HAA detektiert wurden. Kynurenin deshalb, weil es als erster Metabolit im TRP-Stoffwechsel entsteht und seine immunsuppressive Wirkung anhand von Publikationen bestätigt ist

[<sup>150</sup>]. TRP zeigt keine biologische Wirkung und war deshalb zu vernachlässigen [<sup>150</sup>]. 3-HAA diene modellhaft als Endprodukt, da der Abbau von Kynurenin über die Enzyme KMO und KYNU immer über 3-HAA verläuft. Ein Abbau über die KATs wurde dagegen aufgrund der dazu nötigen hohen Substratmengen nach der Michaelis-Menten-Kinetik (KM) dieser Enzymklasse im Vergleich zu KYNU und KMO ausgeschlossen [<sup>191</sup>]. Zwar erfolgte innerhalb dieses murinen Versuches keine Identifikation eines Biomarkers mit Hilfe des systemischen TRP-Stoffwechsels, trotzdem dienen die hier erzeugten Ergebnisse als Grundbefund für zukünftige Studien, möglicherweise im humanen System mit einer großangelegten CED-Patientenkohorte. Wertvoll für zukünftige Studien sollte der Vergleich des lokalen und systemischen TRP-Stoffwechsels mit der Analyse aller relevanten Metaboliten bei CED-Patienten im aktiven Schub sein, sowie die Akquise von Blutplasma, Gewebe, Stuhl und Urinproben von ein und demselben Patienten. Zudem sind klinische Daten, endoskopische Befunde, zusammengefasst als krankheitsspezifische Scores, und Informationen über die Medikation sowie den Krankheitsverlauf unerlässlich. Da eine Akquise von parallel akquirierten Plasma und Gewebe von CED-Patienten innerhalb dieser Arbeit nicht möglich war, soll im nächsten Abschnitt auf die Ergebnisse aus den IHC-basierten Gewebsuntersuchungen von aktiv-erkrankten CED-Patienten (CED-Patientenkohorte-Bayreuth) eingegangen werden.

## 5.2 Lokaler Tryptophanstoffwechsel bei CED-Patienten im Schub

Ziel der IHC-Analysen war es, die Beziehung zwischen dem mukosalen TRP-Stoffwechsel und chronischen Entzündungsmechanismen bei CED-Patienten zu verstehen. Insbesondere konzentrierten sich die Untersuchungen auf die Identifizierung neuer Biomarker sowie auf die Charakterisierung molekularer Mechanismen, die potenzielle therapeutische Ziele bei CED darstellen könnten. Meines Wissens ist dies die erste Arbeit, die ein ausgeprägtes mukosales Enzym- und Metabolitmuster des lokalen TRP-Stoffwechsels bei Patienten mit CED identifiziert hat. Interessanterweise zeigten die Ergebnisse ein höheres Proteinexpressionsniveau des Kynurenin-abbauenden Enzyms KYNU und höhere Konzentrationen des 3-HAA/Kynurenin-Verhältnisses im entzündeten Ileum im Vergleich zum entzündeten Dickdarmgewebe von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Darüber

hinaus identifizierte diese Arbeit KYNU als zentralen mukosalen Regulator von pro- und antiinflammatorischen TRP-Metaboliten und verdeutlichte, dass die Analyse des TRP-Stoffwechsels nicht mit IDO1 enden sollte. In Übereinstimmung mit der Identifizierung einer aktiven chronischen Entzündung anhand des *Riley-Scores* zeigten sich sowohl in Gewebeproben von Morbus Crohn Patienten als auch in Gewebeproben von Colitis ulcerosa Patienten erhöhte Infiltrationen von Immunzellen. Dieses wesentliche und charakteristische Erscheinungsbild des entzündeten Gewebes bei CED-Patienten diene zur Untersuchung möglicher immunmetabolischer Prozesse bei der Entstehung und Progression von CED.

Basierend auf den gewonnenen Daten aus den qRTPCR-basierten Screenings (Abbildung 15) und FACS-Analysen (Abbildung 20) sowie Publikationen aus anderen Forschungsgruppen [192] waren Prozesse des TRP-Stoffwechsels bestimmten Zellen des Immunsystems zuzuordnen. APCs und Granulozyten (insbesondere Neutrophile Granulozyten, DCs und Makrophagen) sind Produzenten von TRP-Metaboliten, während TRP-Metabolite in T Lymphozyten überwiegend über die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor AhR, biologische Effekte auslösen. Dies wird durch die mangelnde Fähigkeit der CD3+ T-Zellen bestätigt, IDO1, TDO, KMO und KYNU zu exprimieren, wodurch Kynurenin durch die gegenwärtig in der Literatur beschriebenen Wege nicht produziert oder abgebaut werden kann [193,194]. In der Literatur gibt es zwar Studien die IHC-basierte Vergleiche von Immunzellmarkern zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa aufzeigen, überraschenderweise jedoch nicht nach lokalisationsabhängigen Inflammationen und CED-Subtypen differenzieren [195,196]. Im Weiteren existiert kein mukosaler Biomarker, welcher zur eindeutigen Identifizierung von CED-Subtypen beiträgt.

Die IHC-Screenings von IDO1 verdeutlichen, dass die Expression dieses Enzyms im entzündeten Gewebe von iMC Patienten im Vergleich zu entzündetem Dickdarmgewebe von Patienten mit MC und CU stark erhöht ist (Abbildung 11B). IDO1 ist das Abbau-limitierende, in der Peripherie lokalisierte Enzym des TRP-Stoffwechsels und ermöglicht es TRP in den Kynurenin Stoffwechsel einzutreten, und im Anschluss weitere biologisch aktive TRP-Metabolite zu produzieren. Darüber hinaus ist IDO1 als entzündungsinduzierbares Enzym beschrieben worden [155,197]. Somit ist IDO1 als ein allgemeiner Aktivitätsmarker für entzündlich mukosale Prozesse zu verstehen, was dadurch bestätigt ist, dass die IDO1 Expression in allen entzündeten Gewebeproben



erhöht vorlag. Gleichzeitig waren im gesunden und nicht-entzündeten Gewebe in allen untersuchten Regionen des GI-Traktes nur sehr geringe Expressionsniveaus von IDO1 zu beobachten. Die Daten deuten darauf hin, dass der TRP-Stoffwechsel bei CED-Patienten eine weitaus größere Rolle bei der Ileum-assoziierten (iMC) als bei der Kolon-assoziierten Inflammation (kMC und kCU) spielt.

Die IHC-Analysen ergaben auch, dass IDO1 und die nachgeschalteten Enzyme des TRP-Stoffwechsels durch Infiltration von Immunzellen an den Ort der aktiven Inflammation transportiert werden. Im Wesentlichen ist es ein Zusammenspiel von gewebsständigen Makrophagen (keine deutliche CD68 Infiltration beobachtet, Abbildung 8A), sowie der Infiltration von DCs und Neutrophilen Granulozyten (für DCs und Neutrophile Granulozyten deutliche Infiltration beobachtet, Abbildung 8B, 8C und 9). Zur Bestätigung dieser Hypothese wurde festgestellt, dass die Mehrheit der Krypten keine IDO1-Proteinexpression aufwies (Abbildung 11A). Da die Daten andererseits keine signifikante Regulation der TDO (Abbildung S6) in den verschiedenen Darmabschnitten aufwiesen, ist dies in Übereinstimmung mit den früheren Befunden von *Badawy et al.* [185] zu betrachten. Nach *Badawy et al.* und wie auch schon zuvor erwähnt, übt die TDO eine eher systemische Funktion aus, indem sie den TRP-Gehalt im Plasma reguliert, während IDO1, welches durch proinflammatorischen Zytokine wie  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$  oder  $\text{IL-1}\beta$  induzierbar ist, die lokalen TRP-Spiegel reguliert [185]. Dies bestätigt auch die lokalisationsabhängige Expression sowie Regulation der IDO1 und TDO. TDO ist in Immunzellen und Epithelzellen nur geringfügig zu detektieren, während IDO1 eine essentielle Rolle bei der Regulation des Immunmetabolismus durch proinflammatorische Zytokine spielt (Abbildung 15 und 18).

Im weiteren Verlauf trugen Analysen des mukosalen Kynureninniveaus mittels *in situ* IHC-Analysen durch Verwendung spezifischer Antikörper zur Aufklärung lokaler Metabolitströme bei. Überraschenderweise und entgegen den Erwartungen, zeigten diese Detektionen keine erhöhten Gewebsspiegel von Kynurenin (Abbildung 12B). Sowohl in kCU Gewebeproben als auch in kMC Gewebeproben unterschieden sich die Kynurenin Spiegel im Vergleich zu den Kontrollen nicht, während die Kynurenin Spiegel bei iMC deutlich reduziert waren. In der Literatur ist beschrieben, dass Kynurenin die Aktivität des AhR in T Lymphozyten und Epithelzellen beeinflusst womit die Aufrechterhaltung der epithelialen Integrität durch die Produktion von IL-22 gesteuert und die Induktion der Reaktionsfähigkeit auf den IL-10-Rezeptor

gewährleistet wird [198]. In diesem Zusammenhang ist beschrieben, dass Kynurenin die Differenzierung von IL-10 produzierenden Tregs beeinflusst [161]. Eine interessante Beobachtung war, dass in den iMC Gewebeproben die verminderten Kynureninniveaus direkten Einfluss auf die Lymphozyteninfiltration haben. Sowohl CD3+ als auch CD8+ T Zellen waren signifikant erhöht, während die FoxP3+ Treg Zellzahlen unverändert blieben (Abbildung 10). In kMC Gewebeproben dagegen, fiel auf, dass es zu keiner signifikanten Infiltration von CD3+ und CD8+ T Zellen kam, wobei die Treg Zellzahlen erhöht vorlagen. Ob Kynurenin möglicherweise mit Hilfe von Chemotaxis-assoziierten Prozessen auf Lymphozyten wirken kann, oder ob es lediglich die Differenzierung von naiven in Effektor- oder Regulator T Zellen begünstigt, ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Eine weitere biologische Funktion von Kynurenin ist, dass es als *Scavenger* für ROS (reaktive Sauerstoffspezies, insbesondere Wasserstoffperoxid) beschrieben ist, welche quantitativ von Neutrophilen Granulozyten gebildet und toxische Wirkungen auf Epithel- und Immunzellen ausüben [199]. Da die IHC-Analysen zeigten, dass die mukosalen Kynureninspiegel bei Patienten mit iMC vermindert vorlagen (Abbildung 12B), implizieren diese Daten, dass eine erhöhte Expression von IDO1 nicht automatisch mit erhöhten mukosalen Kynureninniveaus assoziiert sind. Ein IDO1/Kynurenin-abhängiges immunsuppressives Milieu kann daher nicht länger aufrechterhalten werden, sodass die Inflammation persistieren kann. Zur Untermauerung dieser Hypothese sind Tregs im Vergleich zu den Kontrollen in Gewebeproben von iMC Patienten nicht signifikant erhöht. Auch im Vergleich zu den kMC Gewebeproben waren die Treg Zellzahlen bei iMC Patienten vermindert. Obwohl die IL-10-Sekretion, eines der Haupteffektormoleküle von Treg (früher als im Darm gebildete Tr1-Lymphozyten [200] beschrieben), nicht gemessen wurde, kann spekuliert werden, dass die IL-10-Konzentrationen ebenfalls niedrig sein könnten. Da eine IL-10 Sekretion als inhibierender Effektor auf die IFN $\gamma$ -induzierte IDO1-Expression beschrieben ist, könnte dessen Ausbleiben zu dem hohen IDO1-Signal beitragen, welcher im entzündeten Ileumgewebe von Patienten mit MC zu beobachten ist und als sich selbst-verstärkenden Kreislauf beschrieben werden sollte [156,197].

Um die weitere Degradation von Kynurenin zu verfolgen, erfolgten IHC-Analysen der Proteinexpressionen von KMO und KYNU. Auf IHC-Analysen der KATs und der Produkte KynA sowie Xanthurensäure wurde aufgrund der hohen KM-Werte dieser

Enzyme [150] verzichtet. Die KMO Expressionsniveaus waren im Allgemeinen niedrig, während KYNU in allen Proben mäßig bis hoch exprimiert vorlag (Abbildung 11 B und 11C). Daraus ergibt sich, dass der physiologische Weg des Kynurenin Abbaus im GI-Trakt die Akkumulation von AA und 3-HAA durch das Enzym KYNU begünstigt. Analog dazu zeigten *Giorgini et al.* im Hirngewebe von Mäusen, dass der bevorzugte Weg des Abbaus von Kynurenin über die Akkumulation von AA sowie 3-HAA verläuft und damit das entscheidende Enzyme dieser Abbauroute KYNU ist [201]. In diesem Kontext stellten die hier zugrundeliegenden Ergebnisse zum ersten Mal eine signifikant höhere Expression der KYNU im entzündeten Ileum von Patienten mit MC fest. Die spezifische Rolle von KYNU in der Pathogenese von chronisch-entzündlichen Erkrankungen ist noch nicht geklärt. Eine kürzlich durchgeführte Studie zeigte jedoch, dass KYNU bei Psoriasis stark exprimiert wird [167]. *Harden et al.* stellten die Hypothese auf, dass KYNU den Übergang zwischen Krebs- und chronischen Entzündungserkrankungen durch Modulation der Konzentrationen von Kynurenin und anderen nachgeschalteten TRP-Metaboliten reguliert. Die Ergebnisse aus dieser Arbeit stimmen mit dieser Hypothese überein.

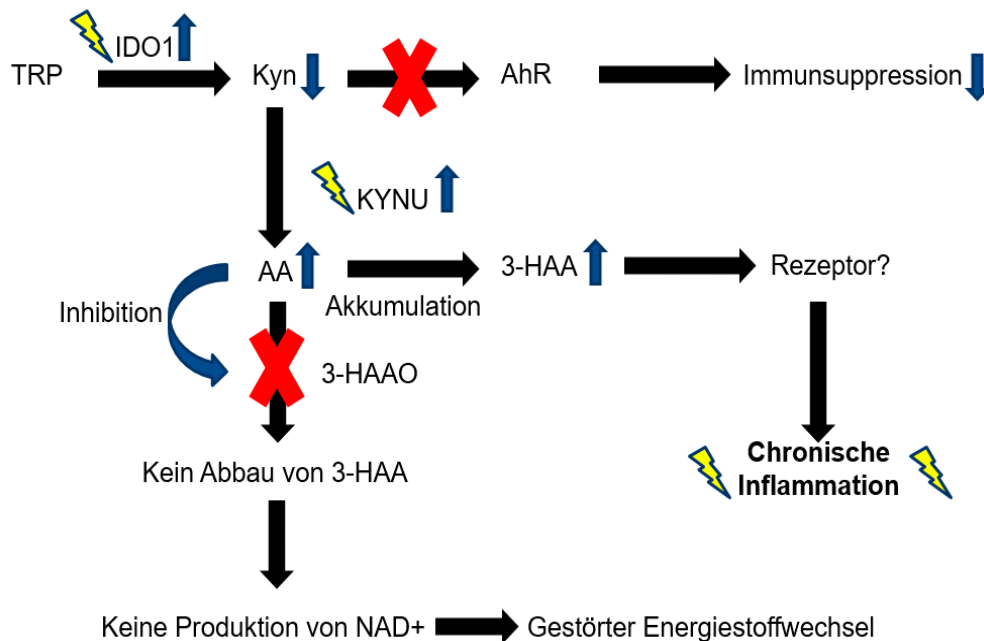
Die erzeugten Daten der IHC-Analysen identifizierten eindeutig unterschiedliche Stoffwechselsignaturen für iMC, kMC und kCU. Die auffallendsten Signaturen waren bei Gewebeproben von iMC Patienten zu beobachten. Hierbei fiel besonders die hohe Expression von IDO1 und die verringerten Kynurenin-Spiegeln im Ileum auf, was vermutlich auf die starke Expression von KYNU in diesem Segment zurückzuführen ist (Abbildung 11B, 11C und 12B). Diese Daten werden durch die Akkumulation von 3-HAA im Ileumgewebe von Patienten mit MC bestätigt (Abbildung 12C). Eine solche Anhäufung fiel weder im Kolongewebe von Patienten mit CU noch im Kolongewebe bei Patienten mit MC auf. Die Akkumulation von 3-HAA könnte auch darauf basieren, dass das abwärts gerichtete Enzym 3-HAAO, welches essentiell für den Abbau von 3-HAA ist, inhibiert wird. Dass der Metabolit AA dazu befähigt ist, 3-HAAO zu inhibieren ist von *Frederick et al.* beschrieben worden [202]. Somit scheint es, dass Kynurenin über KYNU den Metaboliten AA ansteigen lässt, dieser 3-HAAO inhibiert und 3-HAA akkumuliert. Die erzeugten Daten aus den IHC-Analysen und die daraus abgeleitete Hypothese könnte durch die Messung des Verhältnisses zwischen 3-HAA und Kynurenin in zukünftigen Studien unterstützt werden, die sich auf die differenzielle Charakterisierung von Ileum- und Kolon-lokalisierten Inflammationen bei CED-

Patienten konzentrieren. Dabei spiegelte das Verhältnis 3-HAA/Kynurenin die KYNU Enzymaktivität wieder. Da dieses Verhältnis sowohl das regulatorische/immunsuppressive Potential von Kynurenin als auch die potentiell proinflammatorische Aktivität von 3-HAA darstellt, ist zu erwarten, dass es als spezifischer Entzündungsmarker eine größere Vorhersagekraft im Vergleich zu Einzelmessungen von Kynurenin und 3-HAA haben wird. In dieser Arbeit war das Verhältnis 3-HAA/Kynurenin bei Gewebeproben von Ileum-assoziiertem Morbus Crohn im Vergleich zum Gewebe von Kolon-assoziierten Morbus Crohn Patienten erhöht (Abbildung 12D). Während eine Differenzialdiagnose von CED-Subtypen durch endoskopische Untersuchung und klinische Parameter gerechtfertigt ist, bilden die hier vorgestellten Ergebnisse die Grundlage für die Etablierung eines systemischen Biomarkers zur Identifizierung von CED-Subtypen basierend auf den lokalen IHC-Analysen und dienen dem Gastroenterologen als weiteres komplementäres Hilfsmittel. Weitere Studien zur Bestätigung des iMC gewebespezifischen 3-HAA/Kynurenin-Verhältnisses mittels sensitiven LC-MS/MS Messungen in menschlichen Blut- und Stuhlproben sollten Ziel zukünftiger Studien sein.

Die (patho-)physiologische Wirkung von 3-HAA ist noch nicht eindeutig geklärt. Verschiedene Autoren haben über die immunsuppressive Wirkung von 3-HAA berichtet. Diese wurden jedoch durch die Anwendung hoher unphysiologischer Konzentrationen von 3-HAA von bis zu 100  $\mu$ M nachgewiesen, ohne dass die Zytotoxizität anschließend bewertet wurde [170,203,204]. Im Blut gesunder Probanden reichen die 3-HAA-Konzentrationen von 21 bis 383 nM [205]. Im Gewebe sollten die Konzentrationen sogar noch niedriger sein. Es ist zu vermuten, dass niedrige 3-HAA-Konzentrationen die chronische Inflammation beeinflussen können, indem sie auf verschiedene zellspezifische Stoffwechselprozesse abzielen. Erstens hat sich gezeigt, dass die Hemmung von 3-HAAO in Makrophagen die Produktion von NAD<sup>+</sup> verhindert, welches essenziell für die Auflösung von inflammationsbedingten Prozessen ist, wie *Minhas* et al. aufzeigten [171]. Da Makrophagen an Prozessen der Pathogen-Elimination beteiligt sind, kommt es während einer persistierenden Inflammation zu einer kontinuierlichen Infiltration und Aktivität von Neutrophilen Granulozyten sowie Makrophagen. In diesem Zusammenhang wurden Störungen bei der Auflösung (Resolution) der Inflammation als ein Kennzeichen von CED [206] beschrieben. Dies könnte auch ein Grund dafür sein, dass eine erhöhte Infiltration von Neutrophilen

Granulozyten in kMC Gewebeproben im Vergleich zu iMC Gewebeproben zu beobachten war (Abbildung 9B). Ein gestörter Immunstoffwechsel der gewebsständigen Makrophagen in entzündeten Gewebeproben des Ileums von MC Patienten könnte die Chemokin-induzierte Infiltration von Neutrophilen Granulozyten verhindern. Dies würde wiederum mit einem gestörten *Respiratory-Burst* und einer mangelhaften Eliminierung von schädlichen Mikroorganismen einhergehen. Darüber hinaus wurde berichtet, dass 3-HAA die PDK1-Aktivität hemmt [172]. PDK1 ist essentiell für die Aktivität konventioneller T-Zellen, während  $\gamma\delta$ T-Zellen unabhängig von PDK1 aktiviert werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese dieser Arbeit. Während FoxP3+ Tregs nicht ausreichend aktiviert werden, was zu einer fehlerhaften IL-10-Produktion führt, bleiben  $\gamma\delta$ T-Zellen funktionsfähig. Diese Hypothese wurde von *Park et al.* bestätigt, die eine spontane gastrointestinale Inflammation in einem CD4+ T-Zell-spezifischen PDK1 KO-Mausmodell beobachteten [173]. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von *Gargaro et al.* [49] zeigten *Lowe et al.*, dass 3-HAA keinen direkten Einfluss auf die AhR-Aktivität oder die Treg/TH17-Differenzierung hat [207]. Die Autoren beschrieben, dass Cinnabarinsäure (CA) und nicht 3-HAA immunsuppressive Effekte zeigte. CA wiederum induziert die AhR-abhängige Expression von IL-22 in CD4+ T Zellen. 3-HAA wird durch das Enzym Laccase (Synonym FAMIN) zu CA metabolisiert. Interessanterweise stellten *Drobin et al.* in diesem Zusammenhang fest, dass die Expression der Laccase bei Patienten mit MC [208] vermindert ist. Im Allgemeinen wurde das Laccase-Gen als ein Risiko-Loci für MC [57,208] identifiziert. TRP-Metabolite konkurrieren um freie Bindungsstellen des AhR. Die TRP-Metabolite KynA, Xanthurensäure und Kynurenin zeigen die größte Affinität an den AhR [185]. Inwieweit sich 3-HAA und CA in Konzentrationsbereichen anreichern, die für die Bindung an AhR relevant werden, sollte in zukünftigen Studien untersucht werden. Während bekannt ist, dass 3-HAA die Funktion von Immunzellen beeinflusst, ist über die Auswirkungen auf Epithelzellen wenig bekannt. *Wang et al.* zeigten, dass die Expression von MMP2 in vaskulären glatten Muskelzellen nach der Behandlung mit 3-HAA [174] zunahm. Dieser Effekt ist bei CED relevant, da MMP2 vermehrt exprimiert wird [175]. Darüber hinaus verdeutlichen *Badawy et al.*, dass 3-HAA sowohl die Aktivität als auch die Expression der Stickstoffmonoxid-(NO)-Synthase moduliert [209]. Überraschenderweise wurde NO selbst als endogener Inhibitor von IDO1 [210,211] beschrieben. Somit wird der Zusammenhang offensichtlich, dass das Fehlen der NO-

Produktion, zusätzlich zur fehlenden IL-10-Produktion, zu einer anhaltenden Aktivität von IDO1 und einer stetigen Produktion von TRP-Metaboliten führen kann. Abbildung 22 fasst das grundlegende Konzept des deregulierten und durch eine chronische Inflammation induzierten lokalen TRP-Stoffwechsels bei iMC zusammen.



**Abbildung 22: Schema zum deregulierten TRP-Stoffwechsel bei Ileum-assoziiertem Morbus Crohn.** 3-HAA = 3-Hydroxyanthranilsäure, 3-HAAO = 3-Hydroxyanthranilat-3,4-Dioxygenase, AA = Anthranilsäure, AhR = Arylhydrocarbonrezeptor, Kyn = Kynurenin, KYNU = Kynureninase, NAD = Nicotinamadenindinukleotid, TRP = Tryptophan

Um die Ergebnisse in den entzündeten Gewebeproben zu bestätigen, erfolgten in den Kontrollgeweben von gesunden Probanden ohne Anzeichen einer Inflammation parallel Expressionsuntersuchungen von Enzymen und Metaboliten des TRP-Stoffwechsels. Zwischen den nicht-entzündeten Kontrollproben aus Ileum- und Kolongewebe fielen keinerlei Unterschiede im Enzymexpressionsprofil und der Quantifizierung des Metabolitniveaus auf, was den Einfluss der Inflammation auf die CED-Subtypen spezifischen Expressionsmuster bestätigt (Abbildung 11 und 12). Daher ist auszuschließen, dass Unterschiede zwischen Gewebeproben mit Ileum- vs. Kolon-assoziierte Inflammationen bei CED aufgrund einer lokal hohen basalen Expression in den nicht-entzündeten Darmsegmenten auffielen.

Die inflammationsbedingten metabolischen Zustandsänderungen der Immun- und Epithelzellen sind hauptsächlich eine Folge des Fehlens von Kynurenin und einer

Anhäufung von 3-HAA spezifisch für iMC. Doch warum ist es wichtig, eine weitere Unterklassifikation von CED einzuführen und diese mittels Biomarkern differenzieren zu können? Erstens unterstützen neue Publikationen die klinischen Beobachtungen verschiedener Phänotypen von MC Patienten in Abhängigkeit der Lokalisation der Inflammation im GI-Trakt. Zum Beispiel zeigten *Ahmad* et al. Mutationen in den Genen *CARD15* und *NOD2*, die nur und spezifisch im Ileum von Patienten mit MC [76] auftraten. *Naftali* et al. zeigten eine Korrelation zwischen dem verstärkten Vorkommen von *Fusobacterium* und der Krankheitsaktivität von iMC, indem sie ein Profil des Mikrobioms erstellten [75]. Zudem wurden innerhalb von MC Patienten Unterschiede in dem therapeutischen Ansprechen festgestellt, je nachdem, ob die Entzündung vorwiegend im Ileum oder im Kolon lokalisiert war. Insbesondere wurde nachgewiesen, dass Infliximab, ein monoklonaler Antikörper gegen TNF $\alpha$ , bei Patienten mit kMC, nicht aber bei iMC [72] mit einer besseren Prognose assoziiert ist.

Fügt man nun alle Ergebnisse aus den IHC-Analysen des lokalen Enzym- und Metabolitprofils des TRP-Stoffwechsels bei CED-Patienten zusammen, entsteht mittels kombinatorischer IHC ein Gesamtbild, welches als Biomarker Signatur zu verstehen ist (Abbildung 14). Der erste Schritt ist der Nachweis einer aktiven Entzündung. Dies gilt es mit Hilfe der erhöhten Expression von IDO1 zu befunden. Ist IDO1 erhöht exprimiert, erfolgt als nächster Schritt die Differenzialdiagnose zwischen iMC, kMC und kCU. Dabei ist das Expressionsniveau von KYNU entscheidend. Ist KYNU signifikant erhöht liegt ein iMC Phänotyp vor. Bestätigt werden sollte dies mit einem Nachweis des erhöhten lokalen Expressionsniveaus des Verhältnisses von 3-HAA/Kynurenin. Liegt dagegen kein erhöhtes Expressionsniveau von KYNU vor, muss es sich um eine Kolon-assoziierte Inflammation handeln und somit entweder um die CED-Subtypen kMC oder kCU. Um diese beiden Phänotypen voneinander trennen zu können, sollte eine Expressionsanalyse von KMO vorgenommen werden. Ist KMO exprimiert, handelt es sich um Patienten mit CU. Ist KMO dagegen nicht exprimiert, liegt der Kolon-assoziierte Morbus Crohn Phänotyp vor.

Die Ergebnisse der IHC-Analysen bestätigen den aktuellen Nachweis, dass es CED-Subtypen mit ihren eigenen genetischen Prädispositionen, Stoffwechselsignaturen und Heilungsprognosen gibt. Die Daten ermutigen dazu, tiefer in den TRP-Immunstoffwechsel einzutauchen und durch detaillierte Untersuchung von Gewebeproben, nicht nur von einer größeren Patientenzahl mit entzündlicher Aktivität,

sondern auch von CED-Patienten in Remission, die Schlüsselmechanismen für das Erreichen einer kompletten Schleimhautheilung (*Deep Mucosal Healing*) zu identifizieren. Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse, dass eine erhöhte Expression von IDO1, die Überexpression von KYNU, ein erhöhtes Verhältnis der TRP-Metaboliten 3-HAA/Kynurenin sowie das Vorhandensein einer KMO Expression spezifische metabolische Profile bei CED-Patienten offenbaren. Eine Schlüsselfunktion nimmt hierbei KYNU ein. Somit ist KYNU ein vielversprechender potenziell bedeutender Biomarker zur Differenzialdiagnostik bei CED, der in zukünftigen Studien von erheblicher Bedeutung sein könnte. Die gezeigten Daten sollten als ein Grundstein für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze für CED betrachtet werden, z.B. durch Hemmung der KYNU, wodurch die Anhäufung des immunsuppressiven/anti-inflammatorischen Kynurenin vermittelt werden könnte.

### 5.3 Einzelzellscreening des Tryptophanstoffwechsels

Um den zellulären und entzündungsinduzierten TRP-Stoffwechsel zu untersuchen, erfolgte ein qRTPCR-basiertes Screening von Immunzellsubpopulationen und intestinalen Epithelzelllinien. Aus den IHC-Befunden des Nachweises von Enzymen und Metaboliten des lokalen TRP-Stoffwechsels, sowie der Analyse von im Gewebe lokalisierten Immunzellen, konnten schon erste Hinweise auf Enzymzuordnungen der TRP-Stoffwechsel relevanten Enzyme IDO1 und KYNU zu Immunzellen gezogen werden. Mittels *in vitro* Experimenten sollte nun ein detaillierter Überblick über die Verteilung und Regulation aller Enzyme des TRP-Stoffwechsels zu Zelltypen, welche an der Pathogenese von CED beteiligt sind, geschaffen werden. Besonderer Fokus lag auf Zelltypen die (1) Kynurenin produzieren und (2) Kynurenin abbauen. Auch bei diesen Analysen fiel auf, dass proinflammatorische Zytokine Einfluss auf die Expressionsmuster von IDO1 und KYNU nahmen. Bei den Analysen der intestinalen Krebszelllinien konnte die mögliche Rolle des metabolischen IDO1-Kynurenin-KYNU Kreislaufes bei der Kanzerogenese von kolorektalen Adenokarzinomen aufgezeigt werden.

Anhand der Klassifizierung der Screenings in APCs, Lymphozyten sowie intestinalen Epithelzellen war ein eindeutiges Muster erkennbar. Während APCs und intestinale Epithelzellen TRP-Metabolite produzieren und ein intrazellulärer TRP-Stoffwechsel



vorhanden ist, dienen Lymphozyten als Target dieser Metabolite. APCs, insbesondere Makrophagen, scheinen den Großteil an Enzymen des TRP-Stoffwechsel zu exprimieren. Besonders interessant ist, dass proinflammatorische Zytokine, sowohl die IDO1 mRNA Expression (Abbildung 15A), als auch die KYNU mRNA Expression (Abbildung 15D) signifikant ansteigen lassen. Auch in DCs war dieses Muster zu beobachten (Abbildung 15A und 15D). Publikationen anderer Arbeitsgruppen bestätigen diese Beobachtungen zum Expressionsprofil der IDO1 [212–214]. Über KYNU sind jedoch innerhalb der bisher publizierten Arbeiten keine umfangreichen Zuordnungen zu relevanten Zelltypen vorgenommen worden. Zudem spiegelt die mRNA Expressionsmuster der TDO den Stand der Literatur wieder. In den qRTPCR-basierten Screenings waren nur minimale Niveaus an TDO mRNA in APCs detektierbar (Abbildung 15A), womit eine Beteiligung der TDO am peripheren TRP-Stoffwechsel ein weiteres Mal auszuschließen war.

Da eine Regulation der IDO1 und KYNU mRNA Expression lediglich in Makrophagen zu beobachten war, fokussierten sich die nachfolgenden Analysen auf die Regulation der IDO1 und KYNU mRNA Expression in zwei Subpopulationen dieses Zelltyps, nämlich den proinflammatorischen M1 und antiinflammatorischen M2 Makrophagen. Hierbei zeigten nur die M1 Makrophagen eine Regulation der IDO1 und KYNU mRNA (Abbildung 16A und 16B). Beide Enzym mRNA Niveaus steigen nach Stimulation an. Während M2 Makrophagen die Produktion von Kynurenin nach Stimulation signifikant erhöhten sowie kein 3-HAA produzierten, zeigten die M1 Makrophagen ein konstantes Niveau von Kynurenin und 3-HAA (Abbildung 17A und 17B). Verknüpft man die antiinflammatorisch/immunsuppressive Funktion von Kynurenin sowie die potentiell proinflammatorische Funktion von 3-HAA mit den Kenntnissen über den Immunmetabolismus sowie über die Rolle der M1 und M2 Makrophagen darin, ist ein Muster erkennbar. Effektorzellen, in diesem Fall M1 Makrophagen, produzieren TRP-Metabolite abwärtsgerichtet von Kynurenin zur Elimination von Pathogenen, zum Persistieren der Inflammation und zur Produktion von NAD<sup>+</sup> auf Grund eines hohen Energiebedarfes. M2 Makrophagen, die im Kontext einer Kanzerogenese als *Tumor-associated Macrophages* [215] beschrieben sind und regulatorisch wirken, produzieren vermehrt Kynurenin um die Immunantwort abzdämpfen und förderlich auf das Tumorwachstum wirken. Warum in den Zellkulturüberständen von M2 Makrophagen erhöhte Kynureninniveau zu beobachten waren, obwohl das KYNU mRNA Niveau

erhöht vorlag kann nur hypothetisch beantwortet werden. Eine erhöhte Enzymexpression ist nicht gleichbedeutend mit einer erhöhten Aktivität und Umsatzrate von Kynurenin. Zudem sind dies mRNA Daten, welche letztendlich keine eindeutige Bestätigung über die Proteinexpression zulassen. Es besteht die Möglichkeit, dass es zu einer erhöhten Syntheserate der KYNU mRNA gekommen ist, jedoch zu keiner Translation in funktionsfähiges Protein. Zusammenfassend spiegelt das Metabolitprofil der M1 Makrophagen das lokale TRP-Metabolitmuster im betroffenen Ileum bei MC Patienten wieder, wodurch M1 Makrophagen als Hauptregulatoren dieses Phänotyps zu beschreiben sind. Offen bleibt die Frage, welchen Einfluss infiltrierende und gewebständige Makrophagen bei iMC einnehmen.

Bei der weiteren Klassifizierung nach Zelltypen innerhalb dieser Arbeit erfolgte ein qRTPCR-basiertes Screening von Enzymen des TRP-Stoffwechsels in T Zell Subpopulationen. Ein besonderer Fokus lag dabei auf CD3+, sowie CD4+ und CD8+ T Zellen. Erstaunlicherweise konnte weder eine IDO1, noch KYNU oder KMO mRNA Expression in den T Zell Subpopulationen detektiert werden (Tabelle S2). Zur eindeutigen Absicherung dieser Befunde sollte dies sowohl auf mRNA Ebene, als auch auf Proteinebene bestätigt werden. Zudem erfolgte eine Analyse von systemischen im Blut migrierenden, als auch gewebständigen T Zellen von CED- und CAC-Patienten. In keine dieser Untersuchungen waren Signale von Kynurenin auf- oder abbauenden Enzymen zu detektieren, sodass naheliegt, dass ein intrazellulärer TRP-Stoffwechsel in Lymphozyten nicht existiert (Abbildung 20 und Tabelle S2). Kynurenin wird in Lymphozyten somit weder auf- noch abgebaut.

Als zweite potentiell Kynurenin auf- und abbauende Zellpopulation sind intestinale Epithelzellen beschrieben [214,216,217]. Besonders interessant waren die Erkenntnisse im Vergleich der normalen intestinalen Epithelzelllinie (CCD 841 CoN) mit den intestinalen Krebszelllinien (CaCo-2, DLD-1). Entgegen den Analysen der Immunzellen war eine TDO mRNA Expression detektierbar, jedoch nur in den intestinalen Krebszelllinien (Abbildung 18A). Möglicherweise handelt es sich bei einer epithelial-assoziierten Expression der TDO mRNA um einen Biomarker zur Diagnose von intestinalen Krebserkrankungen. Dies wird auch anhand der Literatur diskutiert, ist jedoch noch nicht eindeutig bestätigt [166,218]. Erstaunlicherweise zeigten die CCD 841 CoN Zellen keine KMO mRNA Expression, wobei sowohl in CaCo-2 als auch in DLD-1 Zellen KMO mRNA Expressionen detektierbar waren (Abbildung 18C). Dass

der Metabolit und somit das Produkt von KMO 3-OH-Kyn toxische Effekte begünstigt, ist in Studien bestätigt [219,220]. TDO und KMO könnten, wie zuvor in dieser Arbeit für KNYU in CED beschrieben, eine potentielle Rolle bei der Identifikation einer Biomarker Signatur für Patienten mit kolorektalem Adenokarzinom spielen. In der Literatur ist Kynurenin nicht nur als immunsuppressiver [150] und somit das Immunsystem dämpfender Metabolit beschrieben, sondern hat eine direkte biologische und protumorigene Wirkung auf Epithelzellen [162,163]. Indem Kynurenin den WNT-Signalweg aktiviert und vermehrt  $\beta$ -Catenin gebildet wird, entsteht eine Hyperproliferation wie sie als eine der „*Hallmarks of Cancer*“ beschrieben ist [221,222]. Durch die Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen stieg die Kynureninmenge in Zellkulturüberständen der DLD-1 Zellen stark an (Abbildung 19). Zu erwähnen ist hier der synergistische Effekt der IDO1 und TDO mRNA Expressionen. Beide mRNA Konzentrationen stiegen nach Stimulation an, wodurch das hohe Niveau an Kynurenin erklärbar ist (Abbildung 18A). Weiterhin sind die hohen Kynureninspiegel im Zusammenhang einer fehlenden Regulation und äußerst gering ausfallenden mRNA Expression der KYNÜ zu diskutieren (Abbildung 18D). Innerhalb der Krebszelllinien CaCo-2 und DLD-1 erfolgte keine Regulation der KYNÜ. Die proinflammatorischen Zytokine IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  zeigten somit keinen Effekt. Dagegen war in den normalen intestinalen Epithelzellen CCD 841 CoN eine erhöhte mRNA Expression von sowohl IDO1 als auch KYNÜ zu beobachten (Abbildung 18A und 18D), welche die physiologische Reaktion des intestinalen Epithels auf eine Inflammation abbildet. Beim Vergleich entzündungsinduzierter Veränderungen der mRNA Expressionsprofile von am TRP-Stoffwechsel beteiligten Enzyme in den CCD 841 CoN Zellen war ein ähnliches Expressionsprofil wie in den IHC-Analysen der iMC Patienten zu beobachten. Hervorzuheben ist jedoch, dass entgegen der Ergebnisse der IHC-Analysen Kynurenin ansteigt, um so möglicherweise der Inflammation entgegenzusteuern. Zudem unterstützt es die Daten bezüglich einer hohen Aktivität der KYNÜ in den iMC Gewebeproben. Denn obwohl in den CCD 841 CoN Zellen KYNÜ stark exprimiert wird (Abbildung 18D), ist trotzdem eine hohe Konzentration an Kynurenin vorhanden (Abbildung 19). So scheint es, dass nicht nur eine hohe Proteinexpression der KYNÜ, sondern gleichzeitig eine hohe Aktivität dieses Enzymes bei iMC vorhanden ist.

Die Ergebnisse aus den qRTPCR-basierten Screenings der intestinalen Krebszelllinien bestätigen zusammenfassend die Hypothese, dass im Darm lokalisierte Krebszellen epithelialen Ursprunges versuchen ein konstant hohes Niveau an Kynurenin zu halten. Kynurenin wirkt in diesem Zusammenhang multifaktoriell auf diverse Zelltypen. Zum einen über den oben beschriebenen Mechanismus der  $\beta$ -Catenin Produktion durch intestinale Epithelzellen [162,163], zum anderen mittels der Produktion und Sekretion von Kynurenin, welches von Lymphozyten aufgenommen wird und dort eine Effektorfunktion induziert wird [159,192]. Dass Kynurenin eine Expression von PD-1 und CTLA-4, zwei der bekannten Immun-Checkpoint-Proteine, in Effektor T Zellen induziert und damit einerseits zur antiinflammatorischen Regulation im normalen Darm aber andererseits zur Kanzerogenese beiträgt, ist umfangreich beschrieben [159,223]. Eine besondere Rolle nimmt hierbei der Transkriptionsfaktor AhR ein. Aus diesem Grund erfolgte in einem abschließenden Versuch die entzündungsinduzierte Analyse des AhRs in APCs, Lymphozyten und intestinalen Epithelzellen. Weder in den intestinalen Epithelzellen, noch in APCs fiel eine signifikante entzündungsinduzierte Regulation der mRNA Expression des AhR auf. Dagegen war ein eindeutiger Effekt in CD3+ und CD8+ T Zellen zu beobachten (Abbildung 21). Nach Stimulation mit proinflammatorischen Substanzen zeigten beide T Zell Subpopulationen einen Anstieg der mRNA Expression des AhR. Der Anstieg der AhR mRNA Expression lässt darauf schließen, dass dem TRP-Stoffwechsel komplexe und transzelluläre Mechanismen zu Grunde liegen. Wie schon im oberen Abschnitt beschrieben, bestätigt sich die Theorie von Produzenten (APCs und Epithelzellen) und Konsumenten (Lymphozyten) von TRP-Metaboliten ein weiteres Mal. Während in APCs und den intestinalen Epithelzellen durch eine Inflammation TRP-Metabolite produziert werden, steigt in Lymphozyten die Expression des AhR an. Trotzdem sollte erwähnt werden, dass es sich bei diesen Ergebnissen um mRNA Daten handelt. Um eine direkte Interaktion von Kynurenin mit dem AhR aufzuzeigen und diese eindeutig zu bestätigen sollte mittels konfokaler Mikroskopie die Migration des AhR vom Zytoplasma in den Zellkern dargestellt werden. Doch warum wird die AhR mRNA Expression in CD8+ T Zellen beeinflusst? Die Aktivierung des AhRs könnte eine Transdifferenzierung von Effektor CD8+ T Zellen in regulatorische CD8+ T Zellen begünstigen und somit der Inflammation entgegensteuern oder im Falle einer chronischen-Erkrankung eine Transdifferenzierung in TH17 Zellen hervorrufen. Im

Weiteren dienen die Ergebnisse dazu eine Hypothese bezüglich der biologischen und kompartmentabhängigen Effektorfunktion von TRP-Metaboliten aufzustellen. Während produzierte TRP-Metabolite in APCs und intestinalen Epithelzellen sowohl intrazelluläre als auch transzelluläre Effekte auslösen, sind Lymphozyten auf die Produktion der TRP-Metabolite durch andere Zellen angewiesen. Diese Erkenntnisse können genutzt werden, um die biologische Funktion der TRP-Metabolite innerhalb der Kanzerogenese gezielt zu steuern. Hierfür sollten die Kynurenin spezifischen Transporter der Effektor- und regulatorischen Lymphozyten identifiziert werden, welche den Import von Kynurenin steuern. Mittels Hemmung dieser Transporter könnte die Differenzierung in immunsuppressive regulatorische T Zellen inhibiert werden.

Eine Zielstruktur die gezielt innerhalb einer Krebstherapie angesteuert werden sollte ist der AhR. Aktuell sind lediglich exogene Liganden (u.a. Dioxine) bekannt, welche eine direkte Interaktion mit AhR bestätigen sowie die damit verbundenen Prozesse der Krebsentstehung eindeutig beschreiben [218,224,225]. Dagegen ist der Prozess der endogen gesteuerten Liganden-AhR Interaktion durch TRP-Metabolite in der Kanzerogenese von intestinalen Epithelzellen noch weitgehend unbekannt. Aktuell werden klinische Studie durchgeführt, welche die Inhibition der AhR-Liganden Interaktion untersuchen. Bisherige klinische Studien der Inhibition von IDO1 oder TDO zur Vermeidung einer Produktion von Kynurenin blieben bislang erfolglos. Mit den Erkenntnissen aus dieser Arbeit wird der Grund offensichtlich. Insgesamt existieren drei Enzyme (IDO1, IDO2 und TDO), welche TRP abbauen und Kynurenin aufbauen. Die bisher verwendeten Inhibitoren (u.a. Epacadostat, LM10) zielten lediglich auf eines dieser Enzyme, aber nicht auf die Gesamtheit an Kynurenin aufbauenden Enzymen [223,226]. Dass es einen potentiell synergistischen Effekt gibt, zeigten die Ergebnisse der Analyse von CaCo-2 und DLD-1: In beiden intestinalen Krebszelllinien erfolgte die parallele Detektion von IDO1 und TDO mRNA (Abbildung 18A). Ob eine Inhibition der IDO1 die Induktion der TDO begünstigt oder umgekehrt, gilt es in zukünftigen Studien zu beantworten. Im Weiteren darf die physiologische Rolle von Kynurenin nicht vernachlässigt werden. In wie fern sich eine komplette Blockierung der Kynurenin aufbauenden Enzyme auf das Immunsystem auswirkt, und ob dies potentiell chronisch-entzündliche Erkrankungen, die mit einer überschießenden Immunantwort assoziiert sind, begünstigt, ist bisher nicht geklärt. Ein weiteres potentielles Target in

der Krebstherapie stellt eine gezielte Modulation der KYNU dar. Anhand einer ausbleibenden Regulation der KYNU in den intestinalen Krebszelllinien, könnte dieses Enzym biotechnologisch gezielt zur Induktion der Enzymaktivität und Abbau von Kynurenin angesteuert werden. Somit stünde Kynurenin nicht mehr als biologisch aktiver Metabolit zur Verfügung und kanzerogene Effektorfunktionen blieben aus. Eine gezielte Inhibition der IDO1 und TDO in Epithelzellen, zusätzlich zum Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen PD-1 und CTLA-4 der Lymphozyten ist in meinen Augen am sinnvollsten.

#### 5.4 Fazit

Ziel dieser Arbeit war es einen Biomarker innerhalb des TRP-Stoffwechsels zu identifizieren, der eine eindeutige Diagnose zwischen CED-Subtypen gewährleistet. Anhand des mukosalen TRP-Enzymexpressionsprofiles erfolgte die Identifizierung einer Biomarker Signatur, welche die drei Phänotypen Ileum-assoziiertes Morbus Crohn, Kolon-assoziiertes Morbus Crohn und Kolon-assoziierte Colitis ulcerosa diagnostiziert und somit erfolgreich das Vorhandensein von CED-Subtypen bestätigt. Zudem ermittelte diese Arbeit das Kynurenin abbauende Enzym KYNU als potentielle Zielstruktur einer innovativen Therapiesteuerung nicht nur bei CED, sondern auch bei intestinalen Krebserkrankungen. Zusammenfassend tragen die Ergebnisse dazu bei den TRP-Stoffwechsel nicht nur aus der Perspektive von TRP ab- und Kynurenin-aufbauenden Prozessen zu betrachten, sondern erweitern das Verständnis und die Bedeutung von Kynurenin abbauenden Enzymen innerhalb des Immunmetabolismus und dessen Bedeutung bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen. In der Zukunft wird eine der wichtigsten Herausforderungen in CED und Krebserkrankungen darin bestehen, ihre Pathologien aber vor allen Dingen die Heterogenitäten dieser Krankheiten genauer zu verstehen, um gezielte, personalisierte Therapien zu implementieren. Darüber hinaus ist die Identifizierung neuer, genauerer und spezifischer Biomarker zur Erlangung größtmöglicher diagnostischer Klarheit eine Voraussetzung für die effiziente Anwendung solcher personalisierter Therapien sowie zur Minimierung ungeeigneter und/oder überflüssiger Medikamente. In wie fern die Gesamtheit an biologisch aktiven anti- und proinflammatorischen TRP-Metaboliten und die Interaktion mit potentiellen Zielstrukturen zur Progression bei chronischen-

entzündlichen Erkrankungen beiträgt, gilt es in Zukunft zu klären. Dabei darf nicht außer Acht gelassen werden, dass ein deregulierter TRP-Stoffwechsel lediglich einen von unzähligen pathologischen Stoffwechselprozessen abbildet. Ergänzende Erkenntnisse aus Analysen von weiteren Stoffwechselwegen, nicht nur von Aminosäuren, sondern auch von anderen Substanzklassen, sowie neue innovative Methoden wie die Metabolomik sollten zur Entschlüsselung eines gesamtheitlichen und zusammenhängenden Krankheitsbildes beitragen.

## 6. Literatur

- (1) Scott, A.; Khan, K. M.; Cook, J. L.; Duronio, V. What Is “Inflammation”? Are We Ready to Move beyond Celsus? *Br. J. Sports Med.* **2004**, *38* (3), 248–249. <https://doi.org/10.1136/bjsm.2003.011221>.
- (2) Rocha e Silva, M. A Brief Survey of the History of Inflammation. *Agents Actions* **1978**, *8* (1–2), 45–49. <https://doi.org/10.1007/BF01972401>.
- (3) Ley, K. History of Inflammation Research. In *Physiology of Inflammation*; Springer New York, 2001; pp 1–10. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7512-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7512-5_1).
- (4) Libby, P. ManagedHealthcareExecutive.Com. *Nutr. Rev.* **2007**, *2007* (December). <https://doi.org/10.1301/nr.2007.dec.S140>.
- (5) Lang, H.; Merck-Symposium (7, 1983; Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie. *Pathobiochemie Der Entzündung: Mit 24 Tabellen*; [Bonn, 5. - 7. Mai 1983]; Springer, 1984.
- (6) Fullerton, J. N.; Gilroy, D. W. Resolution of Inflammation: A New Therapeutic Frontier. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15* (8), 551–567. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.39>.
- (7) Medzhitov, R. Origin and Physiological Roles of Inflammation. *Nature* **2008**, *454* (7203), 428–435. <https://doi.org/10.1038/nature07201>.
- (8) Barton, G. M. A Calculated Response: Control of Inflammation by the Innate Immune System. *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation February 1, 2008, pp 413–420. <https://doi.org/10.1172/JCI34431>.
- (9) Medzhitov, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell*. Cell March 2010, pp 771–776. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006>.
- (10) Mills, K. H. G. TLR-Dependent T Cell Activation in Autoimmunity. *Nature Reviews Immunology*. Nat Rev Immunol December 2011, pp 807–822. <https://doi.org/10.1038/nri3095>.
- (11) Medzhitov, R.; Janeway, C. A. Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. *Cell*. Cell Press October 31, 1997, pp 295–298. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80412-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80412-2).
- (12) Mariathasan, S.; Weiss, D. S.; Newton, K.; McBride, J.; O’Rourke, K.; Roose-Girma, M.; Lee, W. P.; Weinrauch, Y.; Monack, D. M.; Dixit, V. M. Cryopyrin Activates the Inflammasome in Response to Toxins and ATP. *Nature* **2006**, *440* (7081), 228–232. <https://doi.org/10.1038/nature04515>.
- (13) Sokol, C. L.; Barton, G. M.; Farr, A. G.; Medzhitov, R. A Mechanism for the Initiation of Allergen-Induced T Helper Type 2 Responses. *Nat. Immunol.* **2008**, *9* (3), 310–318. <https://doi.org/10.1038/ni1558>.
- (14) Rock, K. L.; Kono, H. The Inflammatory Response to Cell Death. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2008**, *3* (1), 99–126. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151456>.
- (15) Bianchi, M. E. DAMPs, PAMPs and Alarmins: All We Need to Know about



- Danger. *J. Leukoc. Biol.* **2007**, 81 (1), 1–5. <https://doi.org/10.1189/jlb.0306164>.
- (16) Majno, G.; Joris, I. *Cells, Tissues, and Disease : Principles of General Pathology*; Oxford University Press, 2004.
- (17) Kumar, V.; Cotran, R. S.; Robbins, S. L. (Stanley L. *Robbins Basic Pathology*; Saunders, 2003.
- (18) Krieger, M.; Acton, S.; Ashkenas, J.; Pearson, A.; Penman, M.; Resnick, D. Molecular Flypaper, Host Defense, and Atherosclerosis. Structure, Binding Properties, and Functions of Macrophage Scavenger Receptors. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268 (7), 4569–4572.
- (19) Pearson, A. M. Scavenger Receptors in Innate Immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **1996**, 8 (1), 20–28. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(96\)80100-2](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(96)80100-2).
- (20) Faure, E.; Equils, O.; Sieling, P. A.; Thomas, L.; Zhang, F. X.; Kirschning, C. J.; Polentarutti, N.; Muzio, M.; Arditi, M. Bacterial Lipopolysaccharide Activates NF- $\kappa$ B through Toll-like Receptor 4 (TLR-4) in Cultured Human Dermal Endothelial Cells. Differential Expression of TLR-4 and TLR-2 in Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275 (15), 11058–11063. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.15.11058>.
- (21) Muzio, M.; Natoli, G.; Sacconi, S.; Levrero, M.; Mantovani, A. The Human Toll Signaling Pathway: Divergence of Nuclear Factor  $\kappa$ B and Jnk/Sapk Activation Upstream of Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 6 (TRAF6). *J. Exp. Med.* **1998**, 187 (12), 2097–2101. <https://doi.org/10.1084/jem.187.12.2097>.
- (22) Guha, M.; Mackman, N. LPS Induction of Gene Expression in Human Monocytes. *Cellular Signalling*. Cell Signal 2001, pp 85–94. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(00\)00149-2](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(00)00149-2).
- (23) Wright, S. D. Toll, a New Piece in the Puzzle of Innate Immunity. *Journal of Experimental Medicine*. The Rockefeller University Press February 15, 1999, pp 605–609. <https://doi.org/10.1084/jem.189.4.605>.
- (24) Libby, P. Inflammation in Atherosclerosis. *Nature*. Nature December 26, 2002, pp 868–874. <https://doi.org/10.1038/nature01323>.
- (25) Kumar, V. Inflammasomes: Pandora’s Box for Sepsis. *Journal of Inflammation Research*. Dove Medical Press Ltd 2018, pp 477–502. <https://doi.org/10.2147/JIR.S178084>.
- (26) Guo, H.; Callaway, J. B.; Ting, J. P. Y. Inflammasomes: Mechanism of Action, Role in Disease, and Therapeutics. *Nature Medicine*. Nature Publishing Group July 9, 2015, pp 677–687. <https://doi.org/10.1038/nm.3893>.
- (27) Wen, H.; Miao, E. A.; Ting, J. P. Y. Mechanisms of NOD-like Receptor-Associated Inflammasome Activation. *Immunity*. Immunity September 19, 2013, pp 432–441. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.037>.
- (28) Muller, W. A. Leukocyte-Endothelial-Cell Interactions in Leukocyte Transmigration and the Inflammatory Response. *Trends in Immunology*. Elsevier Ltd June 1, 2003, pp 326–333. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(03\)00117-0](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(03)00117-0).
- (29) Kretschmer, D.; Rautenberg, M.; Linke, D.; Peschel, A. Peptide Length and Folding State Govern the Capacity of Staphylococcal  $\beta$ -Type Phenol-Soluble

- Modulins to Activate Human Formyl-Peptide Receptors 1 or 2. *J. Leukoc. Biol.* **2015**, 97 (4), 689–697. <https://doi.org/10.1189/jlb.2a0514-275r>.
- (30) Nathan, C. Neutrophils and Immunity: Challenges and Opportunities. *Nature Reviews Immunology*. Nat Rev Immunol March 2006, pp 173–182. <https://doi.org/10.1038/nri1785>.
- (31) Serhan, C. N. Resolution Phase of Inflammation: Novel Endogenous Anti-Inflammatory and Proresolving Lipid Mediators and Pathways. *Annu. Rev. Immunol.* **2007**, 25 (1), 101–137. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141647>.
- (32) Serhan, C. N.; Savill, J. Resolution of Inflammation: The Beginning Programs the End. *Nature Immunology*. Nat Immunol December 2005, pp 1191–1197. <https://doi.org/10.1038/ni1276>.
- (33) Mittal, M.; Siddiqui, M. R.; Tran, K.; Reddy, S. P.; Malik, A. B. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxidants and Redox Signaling*. Antioxid Redox Signal March 1, 2014, pp 1126–1167. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5149>.
- (34) Griffiths, H. R.; Gao, D.; Pararasa, C. Redox Regulation in Metabolic Programming and Inflammation. *Redox Biology*. Elsevier B.V. August 1, 2017, pp 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.023>.
- (35) Serhan, C. N.; Ward, P. A.; Gilroy, D. W.; Ayoub, S. S. *Fundamentals of Inflammation*; Cambridge University Press, 2010.
- (36) Tisoncik, J. R.; Korth, M. J.; Simmons, C. P.; Farrar, J.; Martin, T. R.; Katze, M. G. Into the Eye of the Cytokine Storm. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2012**, 76 (1), 16–32. <https://doi.org/10.1128/mmbr.05015-11>.
- (37) Gruys, E.; Toussaint, M. J. M.; Niewold, T. A.; Koopmans, S. J. Acute Phase Reaction and Acute Phase Proteins. *J. Zhejiang Univ. Sci.* **2005**, 6 B (11), 1045–1056. <https://doi.org/10.1631/jzus.2005.B1045>.
- (38) Firestein, G. S.; Gabriel, S. E.; McInnes, I. B.; O'Dell, J. R. *Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology*.
- (39) Grimbacher, B.; Warnatz, K.; Yong, P. F. K.; Korganow, A. S.; Peter, H. H. The Crossroads of Autoimmunity and Immunodeficiency: Lessons from Polygenic Traits and Monogenic Defects. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Mosby Inc. January 1, 2016, pp 3–17. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.11.004>.
- (40) McDermott, M. F.; Aksentijevich, I.; Galon, J.; McDermott, E. M.; William Ogunkolade, B.; Centola, M.; Mansfield, E.; Gadina, M.; Karenko, L.; Pettersson, T.; McCarthy, J.; Frucht, D. M.; Aringer, M.; Torosyan, Y.; Teppo, A. M.; Wilson, M.; Mehmet Karaarslan, H.; Wan, Y.; Todd, L.; Wood, G.; Schlimgen, R.; Kumarajeewa, T. R.; Cooper, S. M.; Vella, J. P.; Amos, C. I.; Mulley, J.; Quane, K. A.; Molloy, M. G.; Ranki, A.; Powell, R. J.; Hitman, G. A.; O'Shea, J. J.; Kastner, D. L. Germline Mutations in the Extracellular Domains of the 55 KDa TNF Receptor, TNFR1, Define a Family of Dominantly Inherited Autoinflammatory Syndromes. *Cell* **1999**, 97 (1), 133–144. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80721-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80721-7).

- (41) McGonagle, D.; McDermott, M. F. A Proposed Classification of the Immunological Diseases. *PLoS Med.* **2006**, 3 (8), 1242–1248. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030297>.
- (42) Doria, A.; Zen, M.; Bettio, S.; Gatto, M.; Bassi, N.; Nalotto, L.; Ghirardello, A.; Iaccarino, L.; Punzi, L. Autoinflammation and Autoimmunity: Bridging the Divide. *Autoimmunity Reviews*. *Autoimmun Rev* November 2012, pp 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2012.07.018>.
- (43) Ombrello, M. J.; Kastner, D. L. Autoinflammation in 2010: Expanding Clinical Spectrum and Broadening Therapeutic Horizons. *Nature Reviews Rheumatology*. February 2011, pp 82–84. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2010.229>.
- (44) Goldbach-Mansky, R.; Kastner, D. L. Autoinflammation: The Prominent Role of IL-1 in Monogenic Autoinflammatory Diseases and Implications for Common Illnesses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. *J Allergy Clin Immunol* December 2009, pp 1141–1149. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.11.016>.
- (45) Goldbach-Mansky, R. Immunology in Clinic Review Series; Focus on Autoinflammatory Diseases: Update on Monogenic Autoinflammatory Diseases: The Role of Interleukin (IL)-1 and an Emerging Role for Cytokines beyond IL-1. *Clinical and Experimental Immunology*. *Clin Exp Immunol* March 2012, pp 391–404. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04533.x>.
- (46) Masters, S. L.; Simon, A.; Aksentijevich, I.; Kastner, D. L. Horror Autoinflammaticus: The Molecular Pathophysiology of Autoinflammatory Disease. *Annu. Rev. Immunol.* **2009**, 27 (1), 621–668. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141627>.
- (47) Kuhn, A.; Bonsmann, G.; Anders, H. J.; Herzer, P.; Tenbrock, K.; Schneider, M. The Diagnosis and Treatment of Systemic Lupus Erythematosus. *Deutsches Arzteblatt international*. *Dtsch Arztebl Int* June 19, 2015, pp 423–432. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2015.0423>.
- (48) McGonagle, D.; Aziz, A.; Dickie, L. J.; McDermott, M. F. An Integrated Classification of Pediatric Inflammatory Diseases, Based on the Concepts of Autoinflammation and the Immunological Disease Continuum. *Pediatric Research*. *Pediatr Res* May 2009. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31819dbd0a>.
- (49) Arakelyan, A.; Nersisyan, L.; Poghosyan, D.; Khondkaryan, L.; Hakobyan, A.; Löffler-Wirth, H.; Melanitou, E.; Binder, H. Autoimmunity and Autoinflammation: A Systems View on Signaling Pathway Dysregulation Profiles. *PLoS One* **2017**, 12 (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187572>.
- (50) Mitsuyama, K.; Niwa, M.; Takedatsu, H.; Yamasaki, H.; Kuwaki, K.; Yoshioka, S.; Yamauchi, R.; Fukunaga, S.; Torimura, T. Antibody Markers in the Diagnosis of Inflammatory Bowel Disease. *World Journal of Gastroenterology*. Baishideng Publishing Group Co., Limited January 21, 2016, pp 1304–1310. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i3.1304>.
- (51) Yeshi, K.; Ruscher, R.; Hunter, L.; Daly, N. L.; Loukas, A.; Wangchuk, P. Revisiting Inflammatory Bowel Disease: Pathology, Treatments, Challenges and

- Emerging Therapeutics Including Drug Leads from Natural Products. *J. Clin. Med.* **2020**, 9 (5), 1273. <https://doi.org/10.3390/jcm9051273>.
- (52) Zhang, Y. Z.; Li, Y. Y. Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* **2014**, 20 (1), 91–99. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i1.91>.
- (53) Baumgart, D. C.; Sandborn, W. J. Inflammatory Bowel Disease: Clinical Aspects and Established and Evolving Therapies. *Lancet* **2007**, 369 (9573), 1641–1657. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60751-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60751-X).
- (54) Jacobsen, B. A.; Fallingborg, J.; Rasmussen, H. H.; Nielsen, K. R.; Drewes, A. M.; Puho, E.; Nielsen, G. L.; Sørensen, H. T. Increase in Incidence and Prevalence of Inflammatory Bowel Disease in Northern Denmark: A Population-Based Study, 1978-2002. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*. Lippincott Williams and Wilkins 2006, pp 601–606. <https://doi.org/10.1097/00042737-200606000-00005>.
- (55) Teixeira, F. V.; Hosne, R. S.; Sobrado, C. W. Management of Ulcerative Colitis: A Clinical Update. *Journal of Coloproctology*. Sociedade Brasileira de Coloproctologia October 1, 2015, pp 230–237. <https://doi.org/10.1016/j.jcol.2015.08.006>.
- (56) Kaser, A.; Zeissig, S.; Blumberg, R. S. Inflammatory Bowel Disease. *Annu. Rev. Immunol.* **2010**, 28 (1), 573–621. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101225>.
- (57) Jostins, L.; Ripke, S.; Weersma, R. K.; Duerr, R. H.; McGovern, D. P.; Hui, K. Y.; Lee, J. C.; Philip Schumm, L.; Sharma, Y.; Anderson, C. A.; Essers, J.; Mitrovic, M.; Ning, K.; Cleynen, I.; Theatre, E.; Spain, S. L.; Raychaudhuri, S.; Goyette, P.; Wei, Z.; Abraham, C.; Achkar, J. P.; Ahmad, T.; Amininejad, L.; Ananthakrishnan, A. N.; Andersen, V.; Andrews, J. M.; Baidoo, L.; Balschun, T.; Bampton, P. A.; Bitton, A.; Boucher, G.; Brand, S.; Büning, C.; Cohain, A.; Cichon, S.; D'Amato, M.; De Jong, D.; Devaney, K. L.; Dubinsky, M.; Edwards, C.; Ellinghaus, D.; Ferguson, L. R.; Franchimont, D.; Fransen, K.; Gearry, R.; Georges, M.; Gieger, C.; Glas, J.; Haritunians, T.; Hart, A.; Hawkey, C.; Hedl, M.; Hu, X.; Karlsen, T. H.; Kupcinskis, L.; Kugathasan, S.; Latiano, A.; Laukens, D.; Lawrance, I. C.; Lees, C. W.; Louis, E.; Mahy, G.; Mansfield, J.; Morgan, A. R.; Mowat, C.; Newman, W.; Palmieri, O.; Ponsioen, C. Y.; Potocnik, U.; Prescott, N. J.; Regueiro, M.; Rotter, J. I.; Russell, R. K.; Sanderson, J. D.; Sans, M.; Satsangi, J.; Schreiber, S.; Simms, L. A.; Sventoraityte, J.; Targan, S. R.; Taylor, K. D.; Tremelling, M.; Verspaget, H. W.; De Vos, M.; Wijmenga, C.; Wilson, D. C.; Winkelmann, J.; Xavier, R. J.; Zeissig, S.; Zhang, B.; Zhang, C. K.; Zhao, H.; Silverberg, M. S.; Annese, V.; Hakonarson, H.; Brant, S. R.; Radford-Smith, G.; Mathew, C. G.; Rioux, J. D.; Schadt, E. E.; Daly, M. J.; Franke, A.; Parkes, M.; Vermeire, S.; Barrett, J. C.; Cho, J. H.; Barclay, M.; Peyrin-Biroulet, L.; Chamaillard, M.; Colombel, J. F.; Cottone, M.; Croft, A.; D'Incà, R.; Halfvarson, J.; Hanigan, K.; Henderson, P.; Hugot, J. P.; Karban, A.; Kennedy, N. A.; Azam Khan, M.; Lémann, M.; Levine, A.; Massey, D.; Milla, M.; Montgomery, G. W.; Evelyn Ng, S. M.; Oikonomou, I.; Peeters, H.; Proctor, D. D.; Rahier, J. F.; Roberts, R.; Rutgeerts, P.; Seibold, F.; Stronati, L.; Taylor, K. M.; Törkvist, L.; Ublick, K.; Van Limbergen, J.; Van Gossom, A.; Vatn, M. H.; Zhang, H.; Zhang, W.; Andrews, J. M.; Bampton, P. A.; Barclay, M.; Florin, T. H.;

Krishnaprasad, K.; Krishnaprasad, K.; Lawrance, I. C.; Mahy, G.; Montgomery, G. W.; Radford-Smith, G.; Roberts, R. L.; Simms, L. A.; Amininijad, L.; Cleynen, I.; Dewit, O.; Franchimont, D.; Georges, M.; Laukens, D.; Peeters, H.; Rahier, J. F.; Rutgeerts, P.; Theatre, E.; Van Gossum, A.; Vermeire, S.; Aumais, G.; Baidoo, L.; Barrie, A. M.; Beck, K.; Bernard, E. J.; Binion, D. G.; Bitton, A.; Brant, S. R.; Cho, J. H.; Cohen, A.; Croitoru, K.; Daly, M. J.; Datta, L. W.; Deslandres, C.; Duerr, R. H.; Dutridge, D.; Ferguson, J.; Fultz, J.; Goyette, P.; Greenberg, G. R.; Haritunians, T.; Jobin, G.; Katz, S.; Lahaie, R. G.; McGovern, D. P.; Nelson, L.; Ng, S. M.; Ning, K.; Oikonomou, I.; Paré, P.; Proctor, D. D.; Regueiro, M. D.; Rioux, J. D.; Ruggiero, E.; Philip Schumm, L.; Schwartz, M.; Scott, R.; Sharma, Y.; Silverberg, M. S.; Spears, D.; Hillary Steinhart, A.; Stempak, J. M.; Swoger, J. M.; Tsagarelis, C.; Zhang, W.; Zhang, C.; Zhao, H.; Aerts, J.; Ahmad, T.; Arbury, H.; Attwood, A.; Auton, A.; Ball, S. G.; Balmforth, A. J.; Barnes, C.; Barrett, J. C.; Barroso, I.; Barton, A.; Bennett, A. J.; Bhaskar, S.; Blaszczyk, K.; Bowes, J.; Brand, O. J.; Braund, P. S.; Bredin, F.; Breen, G.; Brown, M. J.; Bruce, I. N.; Bull, J.; Burren, O. S.; Burton, J.; Byrnes, J.; Caesar, S.; Cardin, N.; Clee, C. M.; Coffey, A. J.; Connell, J. M. C.; Conrad, D. F.; Cooper, J. D.; Dominiczak, A. F.; Downes, K.; Drummond, H. E.; Dudakia, D.; Dunham, A.; Ebbs, B.; Eccles, D.; Edkins, S.; Edwards, C.; Elliot, A.; Emery, P.; Evans, D. M.; Evans, G.; Eyre, S.; Farmer, A.; Nicol Ferrier, I.; Flynn, E.; Forbes, A.; Forty, L.; Franklyn, J. A.; Frayling, T. M.; Freathy, R. M.; Giannoulatou, E.; Gibbs, P.; Gilbert, P.; Gordon-Smith, K.; Gray, E.; Green, E.; Groves, C. J.; Grozeva, D.; Gwilliam, R.; Hall, A.; Hammond, N.; Hardy, M.; Harrison, P.; Hassanali, N.; Hebaishi, H.; Hines, S.; Hinks, A.; Hitman, G. A.; Hocking, L.; Holmes, C.; Howard, E.; Howard, P.; Howson, J. M. M.; Hughes, D.; Hunt, S.; Isaacs, J. D.; Jain, M.; Jewell, D. P.; Johnson, T.; Jolley, J. D.; Jones, I. R.; Jones, L. A.; Kirov, G.; Langford, C. F.; Lango-Allen, H.; Mark Lathrop, G.; Lee, J.; Lee, K. L.; Lees, C.; Lewis, K.; Lindgren, C. M.; Maisuria-Armer, M.; Maller, J.; Mansfield, J.; Marchini, J. L.; Martin, P.; Massey, D. C. O.; McArdle, W. L.; McGuffin, P.; McLay, K. E.; McVean, G.; Mentzer, A.; Mimmack, M. L.; Morgan, A. E.; Morris, A. P.; Mowat, C.; Munroe, P. B.; Myers, S.; Newman, W.; Nimmo, E. R.; O'Donovan, M. C.; Onipinla, A.; Ovington, N. R.; Owen, M. J.; Palin, K.; Palotie, A.; Parnell, K.; Pearson, R.; Pernet, D.; Perry, J. R. B.; Phillips, A.; Plagnol, V.; Prescott, N. J.; Prokopenko, I.; Quail, M. A.; Rafelt, S.; Rayner, N. W.; Reid, D. M.; Renwick, A.; Ring, S. M.; Robertson, N.; Robson, S.; Russell, E.; St Clair, D.; Sambrook, J. G.; Sanderson, J. D.; Sawcer, S. J.; Schuilenburg, H.; Scott, C. E.; Scott, R.; Seal, S.; Shaw-Hawkins, S.; Shields, B. M.; Simmonds, M. J.; Smyth, D. J.; Somaskantharajah, E.; Spanova, K.; Steer, S.; Stephens, J.; Stevens, H. E.; Stirrups, K.; Stone, M. A.; Strachan, D. P.; Su, Z.; Symmons, D. P. M.; Thompson, J. R.; Thomson, W.; Tobin, M. D.; Travers, M. E.; Turnbull, C.; Vukcevic, D.; Wain, L. V.; Walker, M.; Walker, N. M.; Wallace, C.; Warren-Perry, M.; Watkins, N. A.; Webster, J.; Weedon, M. N.; Wilson, A. G.; Woodburn, M.; Paul Wordsworth, B.; Yau, C.; Young, A. H.; Zeggini, E.; Brown, M. A.; Burton, P. R.; Caulfield, M. J.; Compston, A.; Farrall, M.; Gough, S. C. L.; Hall, A. S.; Hattersley, A. T.; Hill, A. V. S.; Mathew, C. G.; Pembrey, M.; Satsangi, J.; Stratton, M. R.; Worthington, J.; Hurles, M. E.; Duncanson, A.; Ouwehand, W. H.; Parkes, M.; Rahman, N.; Todd, J. A.; Samani, N. J.; Kwiatkowski, D. P.; McCarthy, M. I.; Craddock, N.; Deloukas, P.; Donnelly, P.; Blackwell, J. M.; Bramer, E.; Casas, J. P.; Corvin, A.; Jankowski, J.; Markus, H. S.; Palmer, C. N. A.; Plomin, R.; Rautanen, A.; Trembath, R. C.; Viswanathan, A. C.; Wood, N. W.;

- Spencer, C. C. A.; Band, G.; Bellenguez, C.; Freeman, C.; Hellenthal, G.; Giannoulatou, E.; Pirinen, M.; Pearson, R.; Strange, A.; Blackburn, H.; Bumpstead, S. J.; Dronov, S.; Gillman, M.; Jayakumar, A.; McCann, O. T.; Liddle, J.; Potter, S. C.; Ravindrarajah, R.; Ricketts, M.; Waller, M.; Weston, P.; Widaa, S.; Whittaker, P. Host-Microbe Interactions Have Shaped the Genetic Architecture of Inflammatory Bowel Disease. *Nature* **2012**, 491 (7422), 119–124. <https://doi.org/10.1038/nature11582>.
- (58) Ogura, Y.; Bonen, D. K.; Inohara, N.; Nicolae, D. L.; Chen, F. F.; Ramos, R.; Britton, H.; Moran, T.; Karaliuskas, R.; Duerr, R. H.; Achkar, J. P.; Brant, S. R.; Bayless, T. M.; Kirschner, B. S.; Hanauer, S. B.; Nñez, G.; Cho, J. H. A Frameshift Mutation in *NOD2* Associated with Susceptibility to Crohn's Disease. *Nature* **2001**, 411 (6837), 603–606. <https://doi.org/10.1038/35079114>.
- (59) Anderson, C. A.; Boucher, G.; Lees, C. W.; Franke, A.; D'Amato, M.; Taylor, K. D.; Lee, J. C.; Goyette, P.; Imielinski, M.; Latiano, A.; Lagacé, C.; Scott, R.; Amininejad, L.; Bumpstead, S.; Baidoo, L.; Baldassano, R. N.; Barclay, M.; Bayless, T. M.; Brand, S.; Büning, C.; Colombel, J. F.; Denson, L. A.; De Vos, M.; Dubinsky, M.; Edwards, C.; Ellinghaus, D.; Fehrmann, R. S. N.; Floyd, J. A. B.; Florin, T.; Franchimont, D.; Franke, L.; Georges, M.; Glas, J.; Glazer, N. L.; Guthery, S. L.; Haritunians, T.; Hayward, N. K.; Hugot, J. P.; Jobin, G.; Laukens, D.; Lawrance, I.; Lémann, M.; Levine, A.; Libioulle, C.; Louis, E.; McGovern, D. P.; Milla, M.; Montgomery, G. W.; Morley, K. I.; Mowat, C.; Ng, A.; Newman, W.; Ophoff, R. A.; Papi, L.; Palmieri, O.; Peyrin-Biroulet, L.; Panés, J.; Phillips, A.; Prescott, N. J.; Proctor, D. D.; Roberts, R.; Russell, R.; Rutgeerts, P.; Sanderson, J.; Sans, M.; Schumm, P.; Seibold, F.; Sharma, Y.; Simms, L. A.; Seielstad, M.; Steinhart, A. H.; Targan, S. R.; Van Den Berg, L. H.; Vatn, M.; Verspaget, H.; Walters, T.; Wijmenga, C.; Wilson, D. C.; Westra, H. J.; Xavier, R. J.; Zhao, Z. Z.; Ponsioen, C. Y.; Andersen, V.; Torkvist, L.; Gazouli, M.; Anagnou, N. P.; Karlsen, T. H.; Kupcinskis, L.; Sventoraityte, J.; Mansfield, J. C.; Kugathasan, S.; Silverberg, M. S.; Halfvarson, J.; Rotter, J. I.; Mathew, C. G.; Griffiths, A. M.; Gearry, R.; Ahmad, T.; Brant, S. R.; Chamaillard, M.; Satsangi, J.; Cho, J. H.; Schreiber, S.; Daly, M. J.; Barrett, J. C.; Parkes, M.; Annesse, V.; Hakonarson, H.; Radford-Smith, G.; Duerr, R. H.; Vermeire, S.; Weersma, R. K.; Rioux, J. D. Meta-Analysis Identifies 29 Additional Ulcerative Colitis Risk Loci, Increasing the Number of Confirmed Associations to 47. *Nature Genetics*. Nature Publishing Group 2011, pp 246–252. <https://doi.org/10.1038/ng.764>.
- (60) Tremelling, M.; Cummings, F.; Fisher, S. A.; Mansfield, J.; Gwilliam, R.; Keniry, A.; Nimmo, E. R.; Drummond, H.; Onnie, C. M.; Prescott, N. J.; Sanderson, J.; Bredin, F.; Berzuini, C.; Forbes, A.; Lewis, C. M.; Cardon, L.; Deloukas, P.; Jewell, D.; Mathew, C. G.; Parkes, M.; Satsangi, J. IL23R Variation Determines Susceptibility But Not Disease Phenotype in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* **2007**, 132 (5), 1657–1664. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.02.051>.
- (61) Cobrin, G. M.; Abreu, M. T. Defects in Mucosal Immunity Leading to Crohn's Disease. *Immunological Reviews*. Immunol Rev August 2005, pp 277–295. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00293.x>.
- (62) Targan, S. R.; Karp, L. C. Defects in Mucosal Immunity Leading to Ulcerative Colitis. *Immunological Reviews*. Immunol Rev August 2005, pp 296–305.

- <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00286.x>.
- (63) Di Sabatino, A.; Biancheri, P.; Rovedatti, L.; MacDonald, T. T.; Corazza, G. R. New Pathogenic Paradigms in Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. Inflamm Bowel Dis February 2012, pp 368–371. <https://doi.org/10.1002/ibd.21735>.
- (64) Rovedatti, L.; Kudo, T.; Biancheri, P.; Sarra, M.; Knowles, C. H.; Rampton, D. S.; Corazza, G. R.; Monteleone, G.; Di Sabatino, A.; MacDonald, T. T. Differential Regulation of Interleukin 17 and Interferon  $\gamma$  Production in Inflammatory Bowel Disease. *Gut* **2009**, 58 (12), 1629–1636. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.182170>.
- (65) Geremia, A.; Jewell, D. P. The IL-23/IL-17 Pathway in Inflammatory Bowel Disease. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology*. Expert Rev Gastroenterol Hepatol April 2012, pp 223–237. <https://doi.org/10.1586/egh.11.107>.
- (66) Silva, F. A. R.; Rodrigues, B. L.; Ayrizono, M. de L. S.; Leal, R. F. The Immunological Basis of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2016**, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2097274>.
- (67) Guindi, M.; Riddell, R. H. Indeterminate Colitis. *Journal of Clinical Pathology*. J Clin Pathol December 2004, pp 1233–1244. <https://doi.org/10.1136/jcp.2003.015214>.
- (68) Tremaine, W. J. Diagnosis and Treatment of Indeterminate Colitis. *Gastroenterol. Hepatol. (N. Y.)*. **2011**, 7 (12), 826.
- (69) Satsangi, J.; Silverberg, M. S.; Vermeire, S.; Colombel, J. F. The Montreal Classification of Inflammatory Bowel Disease: Controversies, Consensus, and Implications. *Gut*. BMJ Publishing Group June 2006, pp 749–753. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.082909>.
- (70) Baumgart, D. C.; Sandborn, W. J. Crohn's Disease. In *The Lancet*; Lancet Publishing Group, 2012; Vol. 380, pp 1590–1605. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60026-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60026-9).
- (71) Harrison, T. R.; Zeitz, M.; Schmidt, H. H. J.; Bojarski, C.; Charité - Universitätsmedizin Berlin. *Harrisons Gastroenterologie Und Hepatologie*; ABW, Wiss.-Verl, 2011.
- (72) Arijis, I.; Quintens, R.; Lommel, L. Van; Van Steen, K.; De Hertogh, G.; Lemaire, K.; Schraenen, A.; Perrier, C.; Van Assche, G.; Vermeire, S.; Geboes, K.; Schuit, F.; Rutgeerts, P. Predictive Value of Epithelial Gene Expression Profiles for Response to Infliximab in Crohn's Disease. *Inflamm. Bowel Dis*. **2010**, 16 (12), 2090–2098. <https://doi.org/10.1002/ibd.21301>.
- (73) Ferrante, M.; Henckaerts, L.; Joossens, M.; Pierik, M.; Joossens, S.; Dotan, N.; Norman, G. L.; Altstock, R. T.; Van Steen, K.; Rutgeerts, P.; Van Assche, G.; Vermeire, S. New Serological Markers in Inflammatory Bowel Disease Are Associated with Complicated Disease Behaviour. *Gut* **2007**, 56 (10), 1394–1403. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.108043>.
- (74) Hancock, L.; Becky, J.; Geremia, A.; Cooney, R.; Cummings, F.; Pathan, S.;

- Guo, C.; Warren, B. F.; Mortensen, N.; Ahmad, T.; Jewell, D. Clinical and Molecular Characteristics of Isolated Colonic Crohn's Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2008**, *14* (12), 1667–1677. <https://doi.org/10.1002/ibd.20517>.
- (75) Naftali, T.; Reshef, L.; Kovacs, A.; Porat, R.; Amir, I.; Konikoff, F. M.; Gophna, U. Distinct Microbiotas Are Associated with Ileum-Restricted and Colon-Involving Crohn's Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2016**, *22* (2), 293–302. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000662>.
- (76) Ahmad, T.; Armuzzi, A.; Bunce, M.; Mulcahy-Hawes, K.; Marshall, S. E.; Orchard, T. R.; Crawshaw, J.; Large, O.; De Silva, A.; Cook, J. T.; Barnardo, M.; Cullen, S.; Welsh, K. I.; Jewell, D. P. The Molecular Classification of the Clinical Manifestations of Crohn's Disease. *Gastroenterology* **2002**, *122* (4), 854–866. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.32413>.
- (77) Silverberg, M. S.; Mirea, L.; Bull, S. B.; Murphy, J. E.; Steinhart, A. H.; Greenberg, G. R.; McLeod, R. S.; Cohen, Z.; Wade, J. A.; Siminovitch, K. A. A Population- and Family-Based Study of Canadian Families Reveals Association of HLA DRB1\*0103 with Colonic Involvement in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2003**, *9* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1097/00054725-200301000-00001>.
- (78) Fernandez, L.; Mendoza, J. L.; Martinez, A.; Urcelay, E.; Fernandez-Arquero, M.; Garcia-Paredes, J.; Peña, A. S.; Diaz-Rubio, M.; de la Concha, E. G. IBD1 and IBD3 Determine Location of Crohn's Disease in the Spanish Population. *Inflamm. Bowel Dis.* **2004**, *10* (6), 715–722. <https://doi.org/10.1097/00054725-200411000-00004>.
- (79) Dulai, P. S.; Singh, S.; Vande Casteele, N.; Boland, B. S.; Rivera-Nieves, J.; Ernst, P. B.; Eckmann, L.; Barrett, K. E.; Chang, J. T.; Sandborn, W. J. Should We Divide Crohn's Disease Into Ileum-Dominant and Isolated Colonic Diseases? *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *17* (13), 2634–2643. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2019.04.040>.
- (80) Stein, J. 1956-. *Diagnostik Und Therapiekontrolle Bei Chronisch-Entzündlichen Darmerkrankungen*; UNI-MED-Verl, 2012.
- (81) Sturm, A.; Maaser, C.; Calabrese, E.; Annese, V.; Fiorino, G.; Kucharzik, T.; Vavricka, S. R.; Verstockt, B.; Van Rheenen, P.; Tolan, D.; Taylor, S. A.; Rimola, J.; Rieder, F.; Limdi, J. K.; Laghi, A.; Krustins, E.; Kotze, P. G.; Kopylov, U.; Katsanos, K.; Halligan, S.; Gordon, H.; Lama, Y. G.; Ellul, P.; Eliakim, R.; Castiglione, F.; Burisch, J.; Nunes, P. B.; Bettenworth, D.; Baumgart, D. C.; Stoker, J. Ecco-Esgar Guideline for Diagnostic Assessment in Ibd Part 2: Ibd Scores and General Principles and Technical Aspects. *J. Crohn's Colitis* **2019**, *13* (3), 273–284E. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjy114>.
- (82) Dignass, A.; Eliakim, R.; Magro, F.; Maaser, C.; Chowers, Y.; Geboes, K.; Mantzaris, G.; Reinisch, W.; Colombel, J. F.; Vermeire, S.; Travis, S.; Lindsay, J. O.; Van Assche, G. Second European Evidence-Based Consensus on the Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis Part 1: Definitions and Diagnosis. *Journal of Crohn's and Colitis*. J Crohns Colitis December 2012, pp 965–990. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2012.09.003>.
- (83) Walmsley, R. S.; Ayres, R. C. S.; Pounder, R. E.; Allan, R. N. A Simple Clinical



- Colitis Activity Index. *Gut* **1998**, 43 (1), 29–32. <https://doi.org/10.1136/gut.43.1.29>.
- (84) D’Haens, G.; Sandborn, W. J.; Feagan, B. G.; Geboes, K.; Hanauer, S. B.; Irvine, E. J.; Lémann, M.; Marteau, P.; Rutgeerts, P.; Schölmerich, J.; Sutherland, L. R. A Review of Activity Indices and Efficacy End Points for Clinical Trials of Medical Therapy in Adults With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* **2007**, 132 (2), 763–786. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.12.038>.
- (85) Baron, J. H.; Connell, A. M.; Lennard-Jones, J. E. Variation Between Observers in Describing Mucosal Appearances in Proctocolitis. *Br. Med. J.* **1964**, 1 (5375), 89–92. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5375.89>.
- (86) Gomollón, F.; Dignass, A.; Annese, V.; Tilg, H.; Van Assche, G.; Lindsay, J. O.; Peyrin-Biroulet, L.; Cullen, G. J.; Daperno, M.; Kucharzik, T.; Rieder, F.; Almer, S.; Armuzzi, A.; Harbord, M.; Langhorst, J.; Sans, M.; Chowers, Y.; Fiorino, G.; Juillerat, P.; Mantzaris, G. J.; Rizzello, F.; Vavricka, S.; Gionchetti, P.; Bossuyt, P.; Mijandrusic-Sincic, B.; Douda, T.; Brynskov, J.; Knudsen, T.; Manninen, P.; Carbonnel, F.; Sturm, A.; Koutroubakis, I.; O’Morain, C.; Kohn, A.; Berset, I. P.; Kierkus, J.; Zagorowicz, E.; Diculescu, M. M.; Goldis, A.; Potapov, A.; Jorda, F. C.; Celik, A. F.; Irving, P. 3rd European Evidence-Based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn’s Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *J. Crohn’s Colitis* **2017**, 11 (1), 3–25. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw168>.
- (87) Harvey, R. F.; Bradshaw, J. M. A SIMPLE INDEX OF CROHN’S-DISEASE ACTIVITY. *Lancet* **1980**, 315 (8167), 514. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(80\)92767-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(80)92767-1).
- (88) Bitoun, A.; Bianchi, A.; Contou, J. F.; Delchier, J. C.; Florent, C.; Gendre, J. P.; Rene, E.; Rigaud, D.; Rousselet, M.; Salmeron, M.; See, C.; Soule, J. C.; Therond, J. P.; Vallot, T.; Vienne, J. L.; Viteau, J. M.; Barboteau, M. A.; Bauret, P.; Bonniere, P. Development and Validation of an Endoscopic Index of the Severity for Crohn’s Disease: A Prospective Multicentre Study. *Gut* **1989**, 30 (7), 983–989. <https://doi.org/10.1136/gut.30.7.983>.
- (89) Daperno, M.; D’Haens, G.; Van Assche, G.; Baert, F.; Bulois, P.; Maunoury, V.; Sostegni, R.; Rocca, R.; Pera, A.; Gevers, A.; Mary, J. Y.; Colombel, J. F.; Rutgeerts, P. Development and Validation of a New, Simplified Endoscopic Activity Score for Crohn’s Disease: The SES-CD. *Gastrointest. Endosc.* **2004**, 60 (4), 505–512. [https://doi.org/10.1016/S0016-5107\(04\)01878-4](https://doi.org/10.1016/S0016-5107(04)01878-4).
- (90) Riley, S. A.; Mani, V.; Goodman, M. J.; Dutt, S.; Herd, M. E. Microscopic Activity in Ulcerative Colitis: What Does It Mean? *Gut* **1991**, 32 (2), 174–178. <https://doi.org/10.1136/gut.32.2.174>.
- (91) Geboes, K.; Riddell, R.; Öst, A.; Jensfelt, B.; Persson, T.; Löfberg, R. A Reproducible Grading Scale for Histological Assessment of Inflammation in Ulcerative Colitis. *Gut* **2000**, 47 (3), 404–409. <https://doi.org/10.1136/gut.47.3.404>.
- (92) Zugelassene Personalisierte Medizin in der Übersicht | vfa <https://www.vfa.de/de/arzneimittel-forschung/datenbanken-zu-arzneimitteln/individualisierte-medizin.html> (accessed Jun 11, 2020).

- (93) Was sind Biomarker? Molekulare Whistleblower des Körpers | Roche <https://www.roche.de/about/was-wir-bewegen/personalisierte-medizin/biomarker.html#2000HER2> (accessed Jun 11, 2020).
- (94) Biomarkers Consortium | FNHI <https://fnhi.org/what-we-do/biomarkers-consortium> (accessed Jun 11, 2020).
- (95) Issaq, H. J.; Veenstra, T. D. *Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery*; Elsevier Inc., 2013. <https://doi.org/10.1016/C2011-0-06994-6>.
- (96) Atkinson, A. J.; Colburn, W. A.; DeGruttola, V. G.; DeMets, D. L.; Downing, G. J.; Hoth, D. F.; Oates, J. A.; Peck, C. C.; Schooley, R. T.; Spilker, B. A.; Woodcock, J.; Zeger, S. L. Biomarkers and Surrogate Endpoints: Preferred Definitions and Conceptual Framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. Clin Pharmacol Ther January 1, 2001, pp 89–95. <https://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>.
- (97) Tillett, W. S.; Francis, T. Serological Reactions in Pneumonia with a Nonprotein Somatic Fraction of Pneumococcus. *J. Exp. Med.* **1930**, 52 (4), 561–571. <https://doi.org/10.1084/jem.52.4.561>.
- (98) Allegra, C. J.; Jessup, J. M.; Somerfield, M. R.; Hamilton, S. R.; Hammond, E. H.; Hayes, D. F.; McAllister, P. K.; Morton, R. F.; Schilsky, R. L. American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion: Testing for KRAS Gene Mutations in Patients with Metastatic Colorectal Carcinoma to Predict Response to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody Therapy. *Journal of Clinical Oncology*. American Society of Clinical Oncology April 20, 2009, pp 2091–2096. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.21.9170>.
- (99) Whittemore, A. S.; Cirillo, P. M.; Feldman, D.; Cohn, B. A. Prostate Specific Antigen Levels in Young Adulthood Predict Prostate Cancer Risk: Results from a Cohort of Black and White Americans. *J. Urol.* **2005**, 174 (3), 872–876. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000169262.18000.8a>.
- (100) Viennois, E.; Zhao, Y.; Merlin, D. Biomarkers of Inflammatory Bowel Disease: From Classical Laboratory Tools to Personalized Medicine. *Inflammatory Bowel Diseases*. Lippincott Williams and Wilkins July 20, 2015, pp 2467–2474. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000444>.
- (101) Ruemmele, F. M.; Targan, S. R.; Levy, G.; Dubinsky, M.; Braun, J.; Seidman, E. G. Diagnostic Accuracy of Serological Assays in Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* **1998**, 115 (4), 822–829. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(98\)70252-5](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(98)70252-5).
- (102) Andus, T.; Autschbach, F.; Bachmann, O.; Baretton, G.; Baumgart, D. C.; Bettenworth, D.; Bläker, M.; Buderus, S.; Büning, J.; Ehehalt, R.; Fellermann, K.; Fichtner-feigl, S.; Götz, M.; Gross, C.; Hartmann, F.; Hartmann, P.; Smitten, S. I. Der; Häuser, W.; Helwig, U.; Kaltz, B.; Kanbach, I.; Keller, K.; Klaus, J.; Koletzko, S.; Kroesen, A. J.; Kruis, W.; Kühbacher, T.; Leifeld, L.; Maaser, C.; Matthes, H.; Moog, G.; Ockenga, J.; Pace, A.; Reinshagen, M.; Rijcken, E.; Stange, E. F.; Veltkamp, C.; Zemke, J.; Universität, F. S. Aktualisierte S3-Leitlinie Colitis Ulcerosa Wichtige Neuerungen Durch Die Aktualisierung Der Leitlinie. *Z. Gastroenterol.* **2019**, 32 (August), 1321–1405.

- (103) Stallmach, A.; Hoffmann, J.; Preiß, J. C. Aktualisierte S3-Leitlinie “Diagnostik Und Therapie Des Morbus Crohn” - Aktuell Oder Neu? *Z. Gastroenterol.* **2014**, *52* (12), 1387–1388. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1385679>.
- (104) Joossens, S.; Reinisch, W.; Vermeire, S.; Sendid, B.; Poulain, D.; Peeters, M.; Geboes, K.; Bossuyt, X.; Vandewalle, P.; Oberhuber, G.; Vogelsang, H.; Rutgeerts, P. The Value of Serologic Markers in Indeterminate Colitis: A Prospective Follow-up Study. *Gastroenterology* **2002**, *122* (5), 1242–1247. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.32980>.
- (105) De Jong, N. S. H.; Leach, S. T.; Day, A. S. Fecal S100A12: A Novel Noninvasive Marker in Children with Crohn’s Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2006**, *12* (7), 566–572. <https://doi.org/10.1097/01.ibd.0000227626.72271.91>.
- (106) Oikonomou, K. A.; Kapsoritakis, A. N.; Theodoridou, C.; Karangelis, D.; Germanis, A.; Stefanidis, I.; Potamianos, S. P. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) in Inflammatory Bowel Disease: Association with Pathophysiology of Inflammation, Established Markers, and Disease Activity. *J. Gastroenterol.* **2012**, *47* (5), 519–530. <https://doi.org/10.1007/s00535-011-0516-5>.
- (107) Kayazawa, M.; Saitoh, O.; Kojima, K.; Nakagawa, K.; Tanaka, S.; Tabata, K.; Matsuse, R.; Uchida, K.; Hoshimoto, M.; Hirata, I.; Katsu, K. Lactoferrin in Whole Gut Lavage Fluid as a Marker for Disease Activity in Inflammatory Bowel Disease: Comparison with Other Neutrophil-Derived Proteins. *Am. J. Gastroenterol.* **2002**, *97* (2), 360–369. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2002.05470.x>.
- (108) Vermeire, S.; Van Assche, G.; Rutgeerts, P. Laboratory Markers in IBD: Useful, Magic, or Unnecessary Toys? *Gut*. Gut March 2006, pp 426–431. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.069476>.
- (109) Pepys, M. B.; Druguet, M.; Klass, H. J.; Dash, A. C.; Mirjah, D. D.; Petrie, A. Immunological Studies in Inflammatory Bowel Disease. *Ciba Foundation symposium*. Ciba Found Symp April 26, 1977, pp 283–304. <https://doi.org/10.1002/9780470720288.ch14>.
- (110) Pepys, M. B.; Hirschfield, G. M. C-Reactive Protein: A Critical Update. *J. Clin. Invest.* **2003**, *111* (12), 1805–1812. <https://doi.org/10.1172/jci18921>.
- (111) Røseth, A. G.; Aadland, E.; Jahnsen, J.; Raknerud, N. Assessment of Disease Activity in Ulcerative Colitis by Faecal Calprotectin, a Novel Granulocyte Marker Protein. *Digestion* **1997**, *58* (2), 176–180. <https://doi.org/10.1159/000201441>.
- (112) Sipponen, T.; Kärkkäinen, P.; Savilahti, E.; Kolho, K. L.; Nuutinen, H.; Turunen, U.; Färkkilä, M. Correlation of Faecal Calprotectin and Lactoferrin with an Endoscopic Score for Crohn’s Disease and Histological Findings. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2008**, *28* (10), 1221–1229. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2008.03835.x>.
- (113) Røseth, A. G.; Aadland, E.; Grzyb, K. Normalization of Faecal Calprotectin: A Predictor of Mucosal Healing in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **2004**, *39* (10), 1017–1020. <https://doi.org/10.1080/00365520410007971>.

- (114) Costa, F.; Mumolo, M. G.; Ceccarelli, L.; Bellini, M.; Romano, M. R.; Sterpi, C.; Ricchiuti, A.; Marchi, S.; Bottai, M. Calprotectin Is a Stronger Predictive Marker of Relapse in Ulcerative Colitis than in Crohn's Disease. *Gut* **2005**, *54* (3), 364–368. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.043406>.
- (115) Sipponen, T.; Savilahti, E.; Kärkkäinen, P.; Kolho, K. L.; Nuutinen, H.; Turunen, U.; Färkkilä, M. Fecal Calprotectin, Lactoferrin, and Endoscopic Disease Activity in Monitoring Anti-TNF-Alpha Therapy for Crohn's Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2008**, *14* (10), 1392–1398. <https://doi.org/10.1002/ibd.20490>.
- (116) O'Neill, L. A. J.; Kishton, R. J.; Rathmell, J. A Guide to Immunometabolism for Immunologists. *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group August 25, 2016, pp 553–565. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.70>.
- (117) Kumar, V. Inflammation Research Sails through the Sea of Immunology to Reach Immunometabolism. *Int. Immunopharmacol.* **2019**, *73* (May), 128–145. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.05.002>.
- (118) Newsholme, P.; Curi, R.; Gordon, S.; Newsholme, E. A. Metabolism of Glucose, Glutamine, Long-Chain Fatty Acids and Ketone Bodies by Murine Macrophages. *Biochem. J.* **1986**, *239* (1), 121–125. <https://doi.org/10.1042/bj2390121>.
- (119) HENCH, M. E.; NUNGESTER, W. J. Comparative Study of Host Resistance of Guinea Pigs and Rats. II. Effect of Guinea Pig and Rat Serum on Diplococcus Pneumoniae Type I. *J. Infect. Dis.* **96** (3), 232–241. <https://doi.org/10.1093/infdis/96.3.232>.
- (120) OREN, R.; FARNHAM, A. E.; SAITO, K.; MILOFSKY, E.; KARNOVSKY, M. L. Metabolic Patterns in Three Types of Phagocytizing Cells. *J. Cell Biol.* **1963**, *17* (3), 487–501. <https://doi.org/10.1083/jcb.17.3.487>.
- (121) Fukuzumi, M.; Shinomiya, H.; Shimizu, Y.; Ohishi, K.; Utsumi, S. Endotoxin-Induced Enhancement of Glucose Influx into Murine Peritoneal Macrophages via GLUT 1. *Infect. Immun.* **1996**, *64* (1), 108–112. <https://doi.org/10.1128/iai.64.1.108-112.1996>.
- (122) Norata, G. D.; Caligiuri, G.; Chavakis, T.; Matarese, G.; Netea, M. G.; Nicoletti, A.; O'Neill, L. A. J.; Marelli-Berg, F. M. The Cellular and Molecular Basis of Translational Immunometabolism. *Immunity*. Cell Press September 15, 2015, pp 421–434. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.08.023>.
- (123) Brooks-Worrell, B.; Narla, R.; Palmer, J. P. Islet Autoimmunity in Phenotypic Type 2 Diabetes Patients. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. Blackwell Publishing Ltd 2013, pp 137–140. <https://doi.org/10.1111/dom.12167>.
- (124) Sarikonda, G.; Pettus, J.; Phatak, S.; Sachithanantham, S.; Miller, J. F.; Wesley, J. D.; Cadag, E.; Chae, J.; Ganesan, L.; Mallios, R.; Edelman, S.; Peters, B.; Von Herrath, M. CD8 T-Cell Reactivity to Islet Antigens Is Unique to Type 1 While CD4 T-Cell Reactivity Exists in Both Type 1 and Type 2 Diabetes. *J. Autoimmun.* **2014**, *50*, 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2013.12.003>.
- (125) Winer, D. A.; Winer, S.; Shen, L.; Wadia, P. P.; Yantha, J.; Paltser, G.; Tsui, H.; Wu, P.; Davidson, M. G.; Alonso, M. N.; Leong, H. X.; Glassford, A.; Caimol, M.; Kenkel, J. A.; Tedder, T. F.; McLaughlin, T.; Miklos, D. B.; Dosch, H. M.; Engleman, E. G. B Cells Promote Insulin Resistance through Modulation of T

- Cells and Production of Pathogenic IgG Antibodies. *Nat. Med.* **2011**, 17 (5), 610–617. <https://doi.org/10.1038/nm.2353>.
- (126) Ammirati, E.; Cianflone, D.; Banfi, M.; Vecchio, V.; Palini, A.; De Metrio, M.; Marenzi, G.; Panciroli, C.; Tumminello, G.; Anzuini, A.; Palloshi, A.; Grigore, L.; Garlaschelli, K.; Tramontana, S.; Tavano, D.; Airolidi, F.; Manfredi, A. A.; Catapano, A. L.; Norata, G. D. Circulating CD4+CD25hiCD127lo Regulatory T-Cell Levels Do Not Reflect the Extent or Severity of Carotid and Coronary Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2010**, 30 (9), 1832–1841. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.206813>.
- (127) Ammirati, E.; Cianflone, D.; Vecchio, V.; Banfi, M.; Vermi, A. C.; De Metrio, M.; Grigore, L.; Pellegatta, F.; Pirillo, A.; Garlaschelli, K.; Manfredi, A. A.; Catapano, A. L.; Maseri, A.; Palini, A. G.; Norata, G. D. Effector Memory T Cells Are Associated with Atherosclerosis in Humans and Animal Models. *J. Am. Heart Assoc.* **2012**, 1 (1), 27–41. <https://doi.org/10.1161/JAHA.111.000125>.
- (128) Sala, F.; Cutuli, L.; Grigore, L.; Pirillo, A.; Chiesa, G.; Catapano, A. L.; Norata, G. D. Prevalence of Classical CD14++/CD16 - But Not of Intermediate CD14++/CD16 + Monocytes in Hypoalphalipoproteinemia. *Int. J. Cardiol.* **2013**, 168 (3), 2886–2889. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.03.103>.
- (129) Qu, D.; Shen, L.; Liu, S.; Li, H.; Ma, Y.; Zhang, R.; Wu, K.; Yao, L.; Li, J.; Zhang, J. Chronic Inflammation Confers to the Metabolic Reprogramming Associated with Tumorigenesis of Colorectal Cancer. *Cancer Biol. Ther.* **2017**, 18 (4), 237–244. <https://doi.org/10.1080/15384047.2017.1294292>.
- (130) Biswas, S. K. Metabolic Reprogramming of Immune Cells in Cancer Progression. *Immunity*. Cell Press September 15, 2015, pp 435–449. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.09.001>.
- (131) Mockler, M. B.; Conroy, M. J.; Lysaght, J. Targeting T Cell Immunometabolism for Cancer Immunotherapy; Understanding the Impact of the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Oncology*. Frontiers Research Foundation 2014. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00107>.
- (132) Rodríguez-Prados, J.-C.; Través, P. G.; Cuenca, J.; Rico, D.; Aragonés, J.; Martín-Sanz, P.; Cascante, M.; Boscá, L. Substrate Fate in Activated Macrophages: A Comparison between Innate, Classic, and Alternative Activation. *J. Immunol.* **2010**, 185 (1), 605–614. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901698>.
- (133) Krawczyk, C. M.; Holowka, T.; Sun, J.; Blagih, J.; Amiel, E.; DeBerardinis, R. J.; Cross, J. R.; Jung, E.; Thompson, C. B.; Jones, R. G.; Pearce, E. J. Toll-like Receptor-Induced Changes in Glycolytic Metabolism Regulate Dendritic Cell Activation. *Blood* **2010**, 115 (23), 4742–4749. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-10-249540>.
- (134) Donnelly, R. P.; Loftus, R. M.; Keating, S. E.; Liou, K. T.; Biron, C. A.; Gardiner, C. M.; Finlay, D. K. MTORC1-Dependent Metabolic Reprogramming Is a Prerequisite for NK Cell Effector Function. *J. Immunol.* **2014**, 193 (9), 4477–4484. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401558>.
- (135) Michalek, R. D.; Gerriets, V. A.; Jacobs, S. R.; Macintyre, A. N.; MacIver, N. J.;

- Mason, E. F.; Sullivan, S. A.; Nichols, A. G.; Rathmell, J. C. Cutting Edge: Distinct Glycolytic and Lipid Oxidative Metabolic Programs Are Essential for Effector and Regulatory CD4 + T Cell Subsets. *J. Immunol.* **2011**, *186* (6), 3299–3303. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003613>.
- (136) Doughty, C. A.; Bleiman, B. F.; Wagner, D. J.; Dufort, F. J.; Mataraza, J. M.; Roberts, M. F.; Chiles, T. C. Antigen Receptor-Mediated Changes in Glucose Metabolism in B Lymphocytes: Role of Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling in the Glycolytic Control of Growth. *Blood* **2006**, *107* (11), 4458–4465. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-12-4788>.
- (137) Jha, A. K.; Huang, S. C. C.; Sergushichev, A.; Lampropoulou, V.; Ivanova, Y.; Loginicheva, E.; Chmielewski, K.; Stewart, K. M.; Ashall, J.; Everts, B.; Pearce, E. J.; Driggers, E. M.; Artyomov, M. N. Network Integration of Parallel Metabolic and Transcriptional Data Reveals Metabolic Modules That Regulate Macrophage Polarization. *Immunity* **2015**, *42* (3), 419–430. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.02.005>.
- (138) Gerriets, V. A.; Kishton, R. J.; Nichols, A. G.; MacIntyre, A. N.; Inoue, M.; Ilkayeva, O.; Winter, P. S.; Liu, X.; Priyadarshini, B.; Slawinska, M. E.; Haerberli, L.; Huck, C.; Turka, L. A.; Wood, K. C.; Hale, L. P.; Smith, P. A.; Schneider, M. A.; MacIver, N. J.; Locasale, J. W.; Newgard, C. B.; Shinohara, M. L.; Rathmell, J. C. Metabolic Programming and PDHK1 Control CD4+ T Cell Subsets and Inflammation. *J. Clin. Invest.* **2015**, *125* (1), 194–207. <https://doi.org/10.1172/JCI76012>.
- (139) Beier, U. H.; Angelin, A.; Akimova, T.; Wang, L.; Liu, Y.; Xiao, H.; Koike, M. A.; Hancock, S. A.; Bhatti, T. R.; Han, R.; Jiao, J.; Veasey, S. C.; Sims, C. A.; Baur, J. A.; Wallace, D. C.; Hancock, W. W. Essential Role of Mitochondrial Energy Metabolism in Foxp3+ T-Regulatory Cell Function and Allograft Survival. *FASEB J.* **2015**, *29* (6), 2315–2326. <https://doi.org/10.1096/fj.14-268409>.
- (140) O'Sullivan, D.; vanderWindt, G. W. J.; Huang, S. C. C.; Curtis, J. D.; Chang, C. H.; Buck, M. D. L.; Qiu, J.; Smith, A. M.; Lam, W. Y.; DiPlato, L. M.; Hsu, F. F.; Birnbaum, M. J.; Pearce, E. J.; Pearce, E. L. Memory CD8+ T Cells Use Cell-Intrinsic Lipolysis to Support the Metabolic Programming Necessary for Development. *Immunity* **2014**, *41* (1), 75–88. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.005>.
- (141) Vats, D.; Mukundan, L.; Odegaard, J. I.; Zhang, L.; Smith, K. L.; Morel, C. R.; Greaves, D. R.; Murray, P. J.; Chawla, A. Oxidative Metabolism and PGC-1 $\beta$  Attenuate Macrophage-Mediated Inflammation. *Cell Metab.* **2006**, *4* (1), 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.05.011>.
- (142) Huang, S. C. C.; Everts, B.; Ivanova, Y.; O'Sullivan, D.; Nascimento, M.; Smith, A. M.; Beatty, W.; Love-Gregory, L.; Lam, W. Y.; O'Neill, C. M.; Yan, C.; Du, H.; Abumrad, N. A.; Urban, J. F.; Artyomov, M. N.; Pearce, E. L.; Pearce, E. J. Cell-Intrinsic Lysosomal Lipolysis Is Essential for Alternative Activation of Macrophages. *Nat. Immunol.* **2014**, *15* (9), 846–855. <https://doi.org/10.1038/ni.2956>.
- (143) Bruno, L.; Von Boehmer, H.; Kirberg, J. Cell Division in the Compartment of Naive and Memory T Lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **1996**, *26* (12), 3179–3184.

- <https://doi.org/10.1002/eji.1830261251>.
- (144) Van Der Windt, G. J. W.; O'Sullivan, D.; Everts, B.; Huang, S. C. C.; Buck, M. D.; Curtis, J. D.; Chang, C. H.; Smith, A. M.; Ai, T.; Faubert, B.; Jones, R. G.; Pearce, E. J.; Pearce, E. L. CD8 Memory T Cells Have a Bioenergetic Advantage That Underlies Their Rapid Recall Ability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110* (35), 14336–14341. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221740110>.
- (145) Everts, B.; Amiel, E.; Huang, S. C. C.; Smith, A. M.; Chang, C. H.; Lam, W. Y.; Redmann, V.; Freitas, T. C.; Blagih, J.; Van Der Windt, G. J. W.; Artyomov, M. N.; Jones, R. G.; Pearce, E. L.; Pearce, E. J. TLR-Driven Early Glycolytic Reprogramming via the Kinases TBK1- $\text{IKK}\epsilon$  Supports the Anabolic Demands of Dendritic Cell Activation. *Nat. Immunol.* **2014**, *15* (4), 323–332. <https://doi.org/10.1038/ni.2833>.
- (146) Posokhova, E. N.; Khoshchenko, O. M.; Chasovskikh, M. I.; Pivovarova, E. N.; Dushkin, M. I. Lipid Synthesis in Macrophages during Inflammation in Vivo: Effect of Agonists of Peroxisome Proliferator Activated Receptors  $\alpha$  and  $\gamma$  and of Retinoid X Receptors. *Biochem.* **2008**, *73* (3), 296–304. <https://doi.org/10.1134/s0006297908030097>.
- (147) Feingold, K. R.; Shigenaga, J. K.; Kazemi, M. R.; McDonald, C. M.; Patzek, S. M.; Cross, A. S.; Moser, A.; Grunfeld, C. Mechanisms of Triglyceride Accumulation in Activated Macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **2012**, *92* (4), 829–839. <https://doi.org/10.1189/jlb.1111537>.
- (148) Chen, H. W.; Heiniger, H. J.; Kandutsch, A. A. Relationship between Sterol Synthesis and DNA Synthesis in Phytohemagglutinin Stimulated Mouse Lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1975**, *72* (5), 1950–1954. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.5.1950>.
- (149) Dufort, F. J.; Gumina, M. R.; Ta, N. L.; Tao, Y.; Heyse, S. A.; Scott, D. A.; Richardson, A. D.; Seyfried, T. N.; Chiles, T. C. Glucose-Dependent de Novo Lipogenesis in B Lymphocytes: A Requirement for Atp-Citrate Lyase in Lipopolysaccharide-Induced Differentiation. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289* (10), 7011–7024. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.551051>.
- (150) Badawy, A. A.-B. Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism: Regulatory and Functional Aspects. *Int. J. Tryptophan Res.* **2017**, *10*, 1178646917691938. <https://doi.org/10.1177/1178646917691938>.
- (151) Opitz, C. A.; Heiland, I. Dynamics of NAD-Metabolism: Everything but Constant. *Biochem. Soc. Trans.* **2015**, *43* (6), 1127–1132. <https://doi.org/10.1042/BST20150133>.
- (152) Bender, D. A.; Olufunwa, R. Utilization of Tryptophan, Nicotinamide and Nicotinic Acid as Precursors for Nicotinamide Nucleotide Synthesis in Isolated Rat Liver Cells. *Br. J. Nutr.* **1988**, *59* (2), 279–287. <https://doi.org/10.1079/bjn19880035>.
- (153) Munn, D. H.; Zhou, M.; Attwood, J. T.; Bondarev, I.; Conway, S. J.; Marshall, B.; Brown, C.; Mellor, A. L. Prevention of Allogeneic Fetal Rejection by Tryptophan Catabolism. *Science* (80-. ). **1998**, *281* (5380), 1191–1193. <https://doi.org/10.1126/science.281.5380.1191>.
- (154) Mellor, A. L.; Lemos, H.; Huang, L. Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Tolerance:

- Where Are We Now? *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A. October 27, 2017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01360>.
- (155) Pfefferkorn, E. R.; Rebhun, S.; Eckel, M. Characterization of an Indoleamine 2,3-Dioxygenase Induced by Gamma-Interferon in Cultured Human Fibroblasts. *J. Interferon Res.* **1986**, 6 (3), 267–279. <https://doi.org/10.1089/jir.1986.6.267>.
- (156) Ozaki, Y.; Edelstein, M. P.; Duch, D. S. The Actions of Interferon and Antiinflammatory Agents on Induction of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Human Peripheral Blood Monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, 144 (3), 1147–1153. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(87\)91431-8](https://doi.org/10.1016/0006-291X(87)91431-8).
- (157) Hubbard, T. D.; Murray, I. A.; Perdew, G. H. Indole and Tryptophan Metabolism: Endogenous and Dietary Routes to Ah Receptor Activation. *Drug Metab. Dispos.* **2015**, 43 (10), 1522–1535. <https://doi.org/10.1124/dmd.115.064246>.
- (158) Hao, N.; Whitelaw, M. L. The Emerging Roles of AhR in Physiology and Immunity. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, 86 (5), 561–570. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.07.004>.
- (159) Liu, Y.; Liang, X.; Dong, W.; Fang, Y.; Lv, J.; Zhang, T.; Fiskesund, R.; Xie, J.; Liu, J.; Yin, X.; Jin, X.; Chen, D.; Tang, K.; Ma, J.; Zhang, H.; Yu, J.; Yan, J.; Liang, H.; Mo, S.; Cheng, F.; Zhou, Y.; Zhang, H.; Wang, J.; Li, J.; Chen, Y.; Cui, B.; Hu, Z.-W.; Cao, X.; Xiao-Feng Qin, F.; Huang, B. Tumor-Repopulating Cells Induce PD-1 Expression in CD8+ T Cells by Transferring Kynurenine and AhR Activation. *Cancer Cell* **2018**, 33 (3), 480-494.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.02.005>.
- (160) Fallarino, F.; Grohmann, U.; Hwang, K. W.; Orabona, C.; Vacca, C.; Bianchi, R.; Belladonna, M. L.; Fioretti, M. C.; Alegre, M.-L.; Puccetti, P. Modulation of Tryptophan Catabolism by Regulatory T Cells. *Nat. Immunol.* **2003**, 4 (12), 1206–1212. <https://doi.org/10.1038/ni1003>.
- (161) Mezrich, J. D.; Fechner, J. H.; Zhang, X.; Johnson, B. P.; Burlingham, W. J.; Bradfield, C. A. An Interaction between Kynurenine and the Aryl Hydrocarbon Receptor Can Generate Regulatory T Cells. *J. Immunol.* **2010**, 185 (6), 3190–3198. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903670>.
- (162) Thaker, A. I.; Rao, M. S.; Bishnupuri, K. S.; Kerr, T. A.; Foster, L.; Marinshaw, J. M.; Newberry, R. D.; Stenson, W. F.; Ciorba, M. A. IDO1 Metabolites Activate  $\beta$ -Catenin Signaling to Promote Cancer Cell Proliferation and Colon Tumorigenesis in Mice. *Gastroenterology* **2013**, 145 (2), 416. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.05.002>.
- (163) Park, J. H.; Lee, J. M.; Lee, E. J.; Kim, D. J.; Hwang, W. B. Kynurenine Promotes the Goblet Cell Differentiation of HT-29 Colon Carcinoma Cells by Modulating Wnt, Notch and AhR Signals. *Oncol. Rep.* **2018**, 39 (4), 1930–1938. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6266>.
- (164) Pan, K.; Wang, H.; Chen, M. S.; Zhang, H. K.; Weng, D. S.; Zhou, J.; Huang, W.; Li, J. J.; Song, H. F.; Xia, J. C. Expression and Prognosis Role of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Hepatocellular Carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2008**, 134 (11), 1247–1253. <https://doi.org/10.1007/s00432-008-0395-1>.
- (165) Weinlich, G.; Murr, C.; Richardsen, L.; Winkler, C.; Fuchs, D. Decreased Serum



- Tryptophan Concentration Predicts Poor Prognosis in Malignant Melanoma Patients. *Dermatology* **2006**, 214 (1), 8–14. <https://doi.org/10.1159/000096906>.
- (166) Platten, M.; von Knebel Doeberitz, N.; Oezen, I.; Wick, W.; Ochs, K. Cancer Immunotherapy by Targeting IDO1/TDO and Their Downstream Effectors. *Front. Immunol.* **2015**, 5, 673. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00673>.
- (167) Harden, J. L.; Lewis, S. M.; Lish, S. R.; Suárez-Fariñas, M.; Gareau, D.; Lentini, T.; Johnson-Huang, L. M.; Krueger, J. G.; Lowes, M. A. The Tryptophan Metabolism Enzyme L-Kynureninase Is a Novel Inflammatory Factor in Psoriasis and Other Inflammatory Diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2016**, 137 (6), 1830–1840. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.09.055>.
- (168) Piscianz, E.; Cuzzoni, E.; De Iudicibus, S.; Valencic, E.; Decorti, G.; Tommasini, A. Differential Action of 3-Hydroxyanthranilic Acid on Viability and Activation of Stimulated Lymphocytes. *Int. Immunopharmacol.* **2011**, 11 (12), 2242–2245. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.09.009>.
- (169) Morita, T.; Saito, K.; Takemura, M.; Maekawa, N.; Fujigaki, S.; Fujii, H.; Wada, H.; Takeuchi, S.; Noma, A.; Seishima, M. 3-Hydroxyanthranilic Acid, an L-Tryptophan Metabolite, Induces Apoptosis in Monocyte-Derived Cells Stimulated by Interferon-Gamma. *Ann. Clin. Biochem.* **2001**, 38 (Pt 3), 242–251. <https://doi.org/10.1258/0004563011900461>.
- (170) Lee, S.-M.; Lee, Y.-S.; Choi, J.-H.; Park, S.-G.; Choi, I.-W.; Joo, Y.-D.; Lee, W.-S.; Lee, J.-N.; Choi, I.; Seo, S.-K. Tryptophan Metabolite 3-Hydroxyanthranilic Acid Selectively Induces Activated T Cell Death via Intracellular GSH Depletion. *Immunol. Lett.* **2010**, 132 (1–2), 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2010.05.008>.
- (171) Minhas, P. S.; Liu, L.; Moon, P. K.; Joshi, A. U.; Dove, C.; Mhatre, S.; Contrepois, K.; Wang, Q.; Lee, B. A.; Coronado, M.; Bernstein, D.; Snyder, M. P.; Migaud, M.; Majeti, R.; Mochly-Rosen, D.; Rabinowitz, J. D.; Andreasson, K. I. Macrophage de Novo NAD<sup>+</sup> Synthesis Specifies Immune Function in Aging and Inflammation. *Nat. Immunol.* **2019**, 20 (1), 50–63. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0255-3>.
- (172) Hayashi, T.; Mo, J.-H.; Gong, X.; Rossetto, C.; Jang, A.; Beck, L.; Elliott, G. I.; Kufareva, I.; Abagyan, R.; Broide, D. H.; Lee, J.; Raz, E. 3-Hydroxyanthranilic Acid Inhibits PDK1 Activation and Suppresses Experimental Asthma by Inducing T Cell Apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, 104 (47), 18619–18624. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709261104>.
- (173) Park, S.-G.; Mathur, R.; Long, M.; Hosh, N.; Hao, L.; Hayden, M. S.; Ghosh, S. T Regulatory Cells Maintain Intestinal Homeostasis by Suppressing  $\Gamma\delta$  T Cells. *Immunity* **2010**, 33 (5), 791–803. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.014>.
- (174) Wang, Q.; Ding, Y.; Song, P.; Zhu, H.; Okon, I.; Ding, Y.-N.; Chen, H.-Z.; Liu, D.-P.; Zou, M.-H. Tryptophan-Derived 3-Hydroxyanthranilic Acid Contributes to Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation in Mice In Vivo. *Circulation* **2017**, 136 (23), 2271–2283. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030972>.
- (175) Jakubowska, K.; Pryczynicz, A.; Iwanowicz, P.; Niewiński, A.; Maciorkowska, E.;

- Hapanowicz, J.; Jagodzińska, D.; Kemon, A.; Guzińska-Ustymowicz, K. Expressions of Matrix Metalloproteinases (MMP-2, MMP-7, and MMP-9) and Their Inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2016**, 2016, 2456179. <https://doi.org/10.1155/2016/2456179>.
- (176) Matteoli, G.; Mazzini, E.; Iliev, I. D.; Milet, E.; Fallarino, F.; Puccetti, P.; Chieppa, M.; Rescigno, M. Gut CD103+ Dendritic Cells Express Indoleamine 2,3-Dioxygenase Which Influences T Regulatory/T Effector Cell Balance and Oral Tolerance Induction. *Gut* **2010**, 59 (5), 595–604. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.185108>.
- (177) Wolf, A. M.; Wolf, D.; Rumpold, H.; Moschen, A. R.; Kaser, A.; Obrist, P.; Fuchs, D.; Brandacher, G.; Winkler, C.; Geboes, K.; Rutgeerts, P.; Tilg, H. Overexpression of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Human Inflammatory Bowel Disease. *Clin. Immunol.* **2004**, 113 (1), 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2004.05.004>.
- (178) Nikolaus, S.; Schulte, B.; Al-Massad, N.; Thieme, F.; Schulte, D. M.; Bethge, J.; Rehman, A.; Tran, F.; Aden, K.; Häsl, R.; Moll, N.; Schütze, G.; Schwarz, M. J.; Waetzig, G. H.; Rosenstiel, P.; Krawczak, M.; Szymczak, S.; Schreiber, S. Increased Tryptophan Metabolism Is Associated With Activity of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* **2017**, 153 (6), 1504-1516.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.08.028>.
- (179) Mekada, K.; Abe, K.; Murakami, A.; Nakamura, S.; Nakata, H.; Moriwaki, K.; Obata, Y.; Yoshiki, A. Genetic Differences among C57BL/6 Substrains. *Exp. Anim.* **2009**, 58 (2), 141–149. <https://doi.org/10.1538/expanim.58.141>.
- (180) Thompson, A. A.; Dilworth, S.; Hay, R. J. *ISOLATION AND CULTURE OF COLONIC EPITHELIAL CELLS IN SERUM-FREE MEDIUM*; 1985.
- (181) *Human Tumor Cells in Vitro*; Springer US, 1975. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-1647-4>.
- (182) Chen, T. R.; Hay, R. J.; Macy, M. L. Intercellular Karyotypic Similarity in Near-Diploid Cell Lines of Human Tumor Origins. *Cancer Genet. Cytogenet.* **1983**, 10 (4), 351–362. [https://doi.org/10.1016/0165-4608\(83\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0165-4608(83)90092-4).
- (183) Trainer, D. L.; Kline, T.; McCabe, F. L.; Faucette, L. F.; Feild, J.; Chaikin, M.; Anzano, M.; Reiman, D.; Hoffstein, S.; Li, D. -J.; Gennaro, D.; Buscarino, C.; Lynch, M.; Poste, G.; Greig, R. Biological Characterization and Oncogene Expression in Human Colorectal Carcinoma Cell Lines. *Int. J. Cancer* **1988**, 41 (2), 287–296. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910410221>.
- (184) Ho, G. T.; Cartwright, J. A.; Thompson, E. J.; Bain, C. C.; Rossi, A. G. Resolution of Inflammation and Gut Repair in IBD: Translational Steps Towards Complete Mucosal Healing. *Inflamm. Bowel Dis.* **2020**, 26 (8), 1131–1143. <https://doi.org/10.1093/ibd/izaa045>.
- (185) Badawy, A. A. B. Kynurenine Pathway and Human Systems. *Experimental Gerontology*. Elsevier Inc. January 1, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.110770>.

- (186) Neurath, M. F. Current and Emerging Therapeutic Targets for IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *14* (5), 269–278. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.208>.
- (187) Müller, N.; Myint, A. M.; Schwarz, M. J. Inflammation in Schizophrenia. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*; Academic Press Inc., 2012; Vol. 88, pp 49–68. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398314-5.00003-9>.
- (188) Alberati-Giani, D.; Ricciardi-Castagnoli, P.; Köhler, C.; Cesura, A. M. Regulation of the Kynurenine Metabolic Pathway by Interferon- $\gamma$  in Murine Cloned Macrophages and Microglial Cells. *J. Neurochem.* **1996**, *66* (3), 996–1004. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.66030996.x>.
- (189) Subramanian, S.; Ekbo, A.; Rhodes, J. M. Recent Advances in Clinical Practice: A Systematic Review of Isolated Colonic Crohn's Disease: The Third IBD? *Gut* **2017**, *66* (2), 362–381. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312673>.
- (190) Weiser, M.; Simon, J. M.; Kochar, B.; Tovar, A.; Israel, J. W.; Robinson, A.; Gipson, G. R.; Schaner, M. S.; Herfarth, H. H.; Sartor, R. B.; McGovern, D. P. B.; Rahbar, R.; Sadiq, T. S.; Koruda, M. J.; Furey, T. S.; Sheikh, S. Z. Molecular Classification of Crohn's Disease Reveals Two Clinically Relevant Subtypes. *Gut* **2018**, *67* (1), 36–42. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312518>.
- (191) Enzyme Database - BRENDA <https://www.brenda-enzymes.org/> (accessed Aug 17, 2020).
- (192) Munn, D. H.; Sharma, M. D.; Lee, J. R.; Jhaver, K. G.; Johnson, T. S.; Keskin, D. B.; Marshall, B.; Chandler, P.; Antonia, S. J.; Burgess, R.; Slingsluff, C. L.; Mellor, A. L. Potential Regulatory Function of Human Dendritic Cells Expressing Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Science* (80-. ). **2002**, *297* (5588), 1867–1870. <https://doi.org/10.1126/science.1073514>.
- (193) Heyes, M. P.; Chen, C. Y.; Major, E. O.; Saito, K. Different Kynurenine Pathway Enzymes Limit Quinolinic Acid Formation by Various Human Cell Types. *Biochem. J.* **1997**, *326* (2), 351–356. <https://doi.org/10.1042/bj3260351>.
- (194) Murakami, Y.; Saito, K. Species and Cell Types Difference in Tryptophan Metabolism. *International Journal of Tryptophan Research.* 2013, pp 47–54. <https://doi.org/10.4137/IJTR.S11558>.
- (195) Demetter, P.; De Vos, M.; Van Huysse, J. A.; Baeten, D.; Ferdinande, L.; Peeters, H.; Mielants, H.; Veys, E. M.; De Keyser, F.; Cuvelier, C. A. Colon Mucosa of Patients Both with Spondyloarthritis and Crohn's Disease Is Enriched with Macrophages Expressing the Scavenger Receptor CD163. *Ann. Rheum. Dis.* **2005**, *64* (2), 321–324. <https://doi.org/10.1136/ard.2003.018382>.
- (196) Lissner, D.; Schumann, M.; Batra, A.; Kredel, L.-I.; Köhl, A. A.; Erben, U.; May, C.; Schulzke, J.-D.; Siegmund, B. Monocyte and M1 Macrophage-Induced Barrier Defect Contributes to Chronic Intestinal Inflammation in IBD. *Inflamm. Bowel Dis.* **2015**, *21* (6), 1297–1305. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000384>.
- (197) Badawy, A. A.-B. Tryptophan: The Key to Boosting Brain Serotonin Synthesis in Depressive Illness. *J. Psychopharmacol.* **2013**, *27* (10), 878–893. <https://doi.org/10.1177/0269881113499209>.

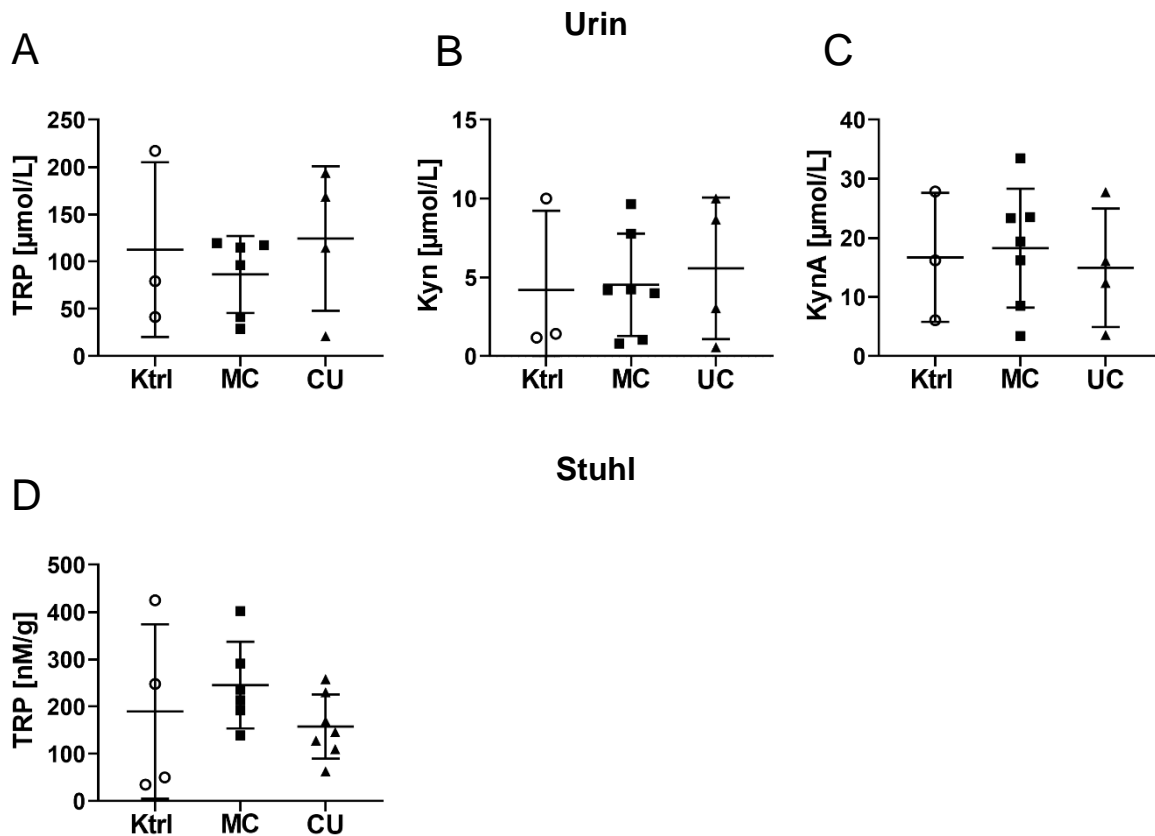
- (198) Lanis, J. M.; Alexeev, E. E.; Curtis, V. F.; Kitzenberg, D. A.; Kao, D. J.; Battista, K. D.; Gerich, M. E.; Glover, L. E.; Kominsky, D. J.; Colgan, S. P. Tryptophan Metabolite Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor Regulates IL-10 Receptor Expression on Intestinal Epithelia. *Mucosal Immunol.* **2017**, *10* (5), 1133–1144. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.133>.
- (199) Genestet, C.; Le Gouellec, A.; Chaker, H.; Polack, B.; Guery, B.; Toussaint, B.; Stasia, M. J. Scavenging of Reactive Oxygen Species by Tryptophan Metabolites Helps *Pseudomonas Aeruginosa* Escape Neutrophil Killing. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, *73*, 400–410. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.06.003>.
- (200) Barnes, M. J.; Powrie, F. Regulatory T Cells Reinforce Intestinal Homeostasis. *Immunity*. September 18, 2009, pp 401–411. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.011>.
- (201) Giorgini, F.; Huang, S. Y.; Sathyaikumar, K. V.; Notarangelo, F. M.; Thomas, M. A. R.; Tatarina, M.; Wu, H. Q.; Schwarcz, R.; Muchowski, P. J. Targeted Deletion of Kynurenine 3-Monooxygenase in Mice a New Tool for Studying Kynurenine Pathway Metabolism in Periphery and Brain. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (51), 36554–36566. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.503813>.
- (202) Frédérick, R. Chapter 29: Inhibition of the Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism. In *Targeting the Broadly Pathogenic Kynurenine Pathway*; Springer International Publishing, 2015; pp 393–406. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-11870-3\\_29](https://doi.org/10.1007/978-3-319-11870-3_29).
- (203) Weber, W. P.; Feder-Mengus, C.; Chiarugi, A.; Rosenthal, R.; Reschner, A.; Schumacher, R.; Zajac, P.; Misteli, H.; Frey, D. M.; Oertli, D.; Heberer, M.; Spagnoli, G. C. Differential Effects of the Tryptophan Metabolite 3-Hydroxyanthranilic Acid on the Proliferation of Human CD8 T Cells Induced by TCR Triggering or Homeostatic Cytokines. *Eur. J. Immunol.* **2006**, *36* (2), 296–304. <https://doi.org/10.1002/eji.200535616>.
- (204) Lee, W.-S.; Lee, S.-M.; Kim, M.-K.; Park, S.-G.; Choi, I.-W.; Choi, I.; Joo, Y.-D.; Park, S.-J.; Kang, S.-W.; Seo, S.-K. The Tryptophan Metabolite 3-Hydroxyanthranilic Acid Suppresses T Cell Responses by Inhibiting Dendritic Cell Activation. *Int. Immunopharmacol.* **2013**, *17* (3), 721–726. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.08.018>.
- (205) Pawlak, K.; Kowalewska, A.; Mysliwiec, M.; Pawlak, D. 3-Hydroxyanthranilic Acid Is Independently Associated with Monocyte Chemoattractant Protein-1 (CCL2) and Macrophage Inflammatory Protein-1beta (CCL4) in Patients with Chronic Kidney Disease. *Clin. Biochem.* **2010**, *43* (13–14), 1101–1106. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.06.008>.
- (206) Na, Y. R.; Stakenborg, M.; Seok, S. H.; Matteoli, G. Macrophages in Intestinal Inflammation and Resolution: A Potential Therapeutic Target in IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *16* (9), 531–543. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0172-4>.
- (207) Drobin, K.; Assadi, G.; Hong, M. G.; Andersson, E.; Fredolini, C.; Forsström, B.; Reznichenko, A.; Akhter, T.; Ek, W. E.; Bonfiglio, F.; Hansen, M. B.; Sandberg, K.; Greco, D.; Repsilber, D.; Schwenk, J. M.; D'Amato, M.; Halfvarson, J.

- Targeted Analysis of Serum Proteins Encoded at Known Inflammatory Bowel Disease Risk Loci. *Inflamm. Bowel Dis.* **2019**, 25 (2), 306–316. <https://doi.org/10.1093/ibd/izy326>.
- (208) Assadi, G.; Vesterlund, L.; Bonfiglio, F.; Mazzurana, L.; Cordeddu, L.; Schepis, D.; Mjösberg, J.; Ruhrmann, S.; Fabbri, A.; Vukojevic, V.; Percipalle, P.; Salomons, F. A.; Laurencikiene, J.; Törkvist, L.; Halfvarson, J.; D'Amato, M. Functional Analyses of the Crohn's Disease Risk Gene LACC1. *PLoS One* **2016**, 11 (12), e0168276. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168276>.
- (209) Sekkaï, D.; Guittet, O.; Lemaire, G.; Tenu, J. P.; Lepoivre, M. Inhibition of Nitric Oxide Synthase Expression and Activity in Macrophages by 3-Hydroxyanthranilic Acid, a Tryptophan Metabolite. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, 340 (1), 117–123. <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.9913>.
- (210) Hucke, C.; MacKenzie, C. R.; Adjogble, K. D. Z.; Takikawa, O.; Däubener, W. Nitric Oxide-Mediated Regulation of Gamma Interferon-Induced Bacteriostasis: Inhibition and Degradation of Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Infect. Immun.* **2004**, 72 (5), 2723–2730. <https://doi.org/10.1128/iai.72.5.2723-2730.2004>.
- (211) Thomas, S. R.; Terentis, A. C.; Cai, H.; Takikawa, O.; Levina, A.; Lay, P. A.; Freewan, M.; Stocker, R. Post-Translational Regulation of Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity by Nitric Oxide. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282 (33), 23778–23787. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700669200>.
- (212) Yamazaki, F.; Kuroiwa, T.; Takikawa, O.; Kido, R. Human Indolylamine 2,3-Dioxygenase. Its Tissue Distribution, and Characterization of the Placental Enzyme. *Biochem. J.* **1985**, 230 (3), 635–638. <https://doi.org/10.1042/bj2300635>.
- (213) Uhlén, M.; Fagerberg, L.; Hallström, B. M.; Lindskog, C.; Oksvold, P.; Mardinoglu, A.; Sivertsson, Å.; Kampf, C.; Sjöstedt, E.; Asplund, A.; Olsson, I. M.; Edlund, K.; Lundberg, E.; Navani, S.; Szgyarto, C. A. K.; Odeberg, J.; Djureinovic, D.; Takanen, J. O.; Hober, S.; Alm, T.; Edqvist, P. H.; Berling, H.; Tegel, H.; Mulder, J.; Rockberg, J.; Nilsson, P.; Schwenk, J. M.; Hamsten, M.; Von Feilitzen, K.; Forsberg, M.; Persson, L.; Johansson, F.; Zwahlen, M.; Von Heijne, G.; Nielsen, J.; Pontén, F. Tissue-Based Map of the Human Proteome. *Science (80-. )*. **2015**, 347 (6220). <https://doi.org/10.1126/science.1260419>.
- (214) Vigneron, N.; van Baren, N.; Van den Eynde, B. J. Expression Profile of the Human IDO1 Protein, a Cancer Drug Target Involved in Tumoral Immune Resistance. *Oncoimmunology* **2015**, 4 (5). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2014.1003012>.
- (215) Zhou, J.; Tang, Z.; Gao, S.; Li, C.; Feng, Y.; Zhou, X. Tumor-Associated Macrophages: Recent Insights and Therapies. *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A. February 25, 2020, p 188. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00188>.
- (216) Alvarado, D. M.; Chen, B.; Iticovici, M.; Thaker, A. I.; Dai, N.; VanDussen, K. L.; Shaikh, N.; Lim, C. K.; Guillemin, G. J.; Tarr, P. I.; Ciorba, M. A. Epithelial Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 Modulates Aryl Hydrocarbon Receptor and Notch Signaling to Increase Differentiation of Secretory Cells and Alter Mucus-Associated Microbiota. *Gastroenterology* **2019**, 157 (4), 1093–1108.e11.

- <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.07.013>.
- (217) Ciorba, M. A. Indoleamine 2,3 Dioxygenase in Intestinal Disease. *Current Opinion in Gastroenterology*. NIH Public Access March 2013, pp 146–152. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32835c9cb3>.
- (218) Cheong, J. E.; Sun, L. Targeting the IDO1/TDO2–KYN–AhR Pathway for Cancer Immunotherapy – Challenges and Opportunities. *Trends in Pharmacological Sciences*. Elsevier Ltd March 1, 2018, pp 307–325. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.11.007>.
- (219) Skouras, C.; Zheng, X.; Binnie, M.; Homer, N. Z. M.; Murray, T. B. J.; Robertson, D.; Briody, L.; Paterson, F.; Spence, H.; Derr, L.; Hayes, A. J.; Tsoumanis, A.; Lyster, D.; Parks, R. W.; Garden, O. J.; Iredale, J. P.; Uings, I. J.; Liddle, J.; Wright, W. L.; Dukes, G.; Webster, S. P.; Mole, D. J. Increased Levels of 3-Hydroxykynurenine Parallel Disease Severity in Human Acute Pancreatitis OPEN. *Nat. Publ. Gr.* **2016**. <https://doi.org/10.1038/srep33951>.
- (220) Wilson, K.; Auer, M.; Binnie, M.; Zheng, X.; Pham, N. T.; Webster, S. P.; Mole, D. J. Overexpression of Human Kynurenine-3-Monooxygenase Protects against 3-Hydroxykynurenine-Mediated Apoptosis through Bidirectional Nonlinear Feedback. *Cell Death Dis.* **2016**, 7. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.87>.
- (221) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. Elsevier January 7, 2000, pp 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).
- (222) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell*. Elsevier March 4, 2011, pp 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- (223) Platten, M.; Nollen, E. A. A.; Röhrig, U. F.; Fallarino, F.; Opitz, C. A. Tryptophan Metabolism as a Common Therapeutic Target in Cancer, Neurodegeneration and Beyond. *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group May 1, 2019, pp 379–401. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0016-5>.
- (224) Opitz, C. A.; Litzenburger, U. M.; Sahm, F.; Ott, M.; Tritschler, I.; Trump, S.; Schumacher, T.; Jestaedt, L.; Schrenk, D.; Weller, M.; Jugold, M.; Guillemin, G. J.; Miller, C. L.; Lutz, C.; Radlwimmer, B.; Lehmann, I.; Von Deimling, A.; Wick, W.; Platten, M. An Endogenous Tumour-Promoting Ligand of the Human Aryl Hydrocarbon Receptor. *Nature* **2011**, 478 (7368), 197–203. <https://doi.org/10.1038/nature10491>.
- (225) Ehrlich, A. K.; Pennington, J. M.; Bisson, W. H.; Kolluri, S. K.; Kerkvliet, N. I. TCDD, FICZ, and Other High Affinity AhR Ligands Dose-Dependently Determine the Fate of CD4+ T Cell Differentiation. *Toxicol. Sci.* **2018**, 161 (2), 310–320. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx215>.
- (226) Prendergast, G. C.; Mondal, A.; Dey, S.; Laury-Kleintop, L. D.; Muller, A. J. Inflammatory Reprogramming with IDO1 Inhibitors: Turning Immunologically Unresponsive ‘Cold’ Tumors ‘Hot.’ *Trends in Cancer*. Cell Press January 1, 2018, pp 38–58. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.11.005>.

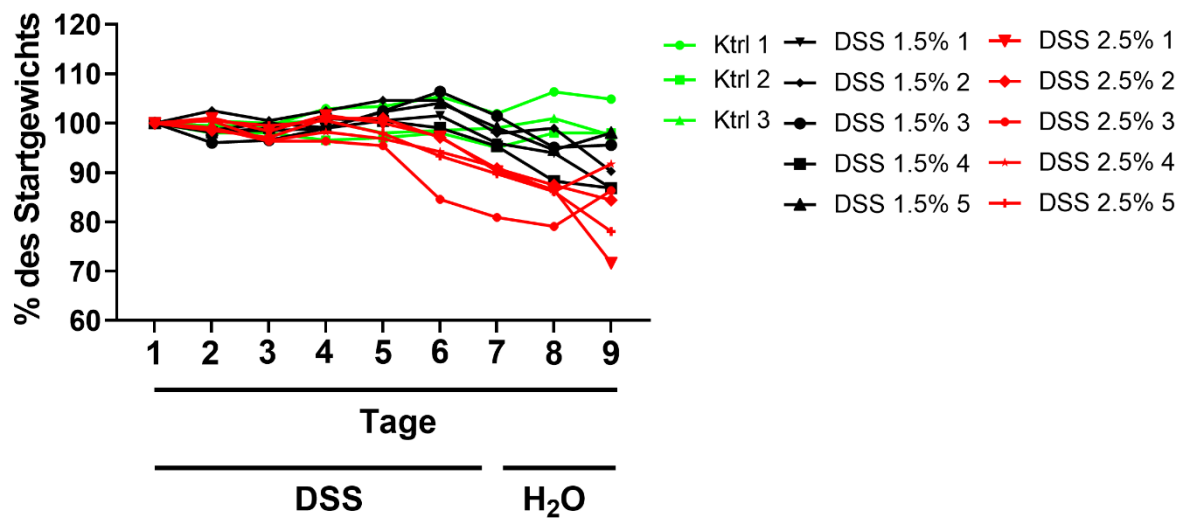
## 7. Supplements

### 7.1 Konzentrationsbestimmungen von Tryptophan, Kynurenin und Kynureninsäure in Urin- und Stuhlproben von CED-Patienten in Remission



**Abbildung S1: Konzentrationsbestimmung von TRP, Kyn und KynA in Urin- und Stuhlproben mittels ELISA.** (A-C) Die Vermessung der Urinproben erfolgte nach Zentrifugation und Palettierung der zellulären Bestandteile mittels ELISA-Kits der Firma Neuroimmun GmbH. (D) Die Analyse der unbehandelten Stuhlproben fand mittels ELISA-Kits der Firma Neuroimmun GmbH statt. Graphen dargestellt als Durchschnitt  $\pm$  SD von  $n = 3 - 7$  der jeweiligen Patientenkohorten und Kontrollen. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test. ELISA = *Enzym-linked Immunosorbent Assay*, Ktrl = Kontrolle, Kyn = Kynurenin, KynA = Kynureninsäure, MC = Morbus Crohn, CU = Colitis ulcerosa, TRP = Tryptophan

## 7.2 Dextransulfat-Natrium induzierter Gewichtsverlust von C57BL/6 Mäusen

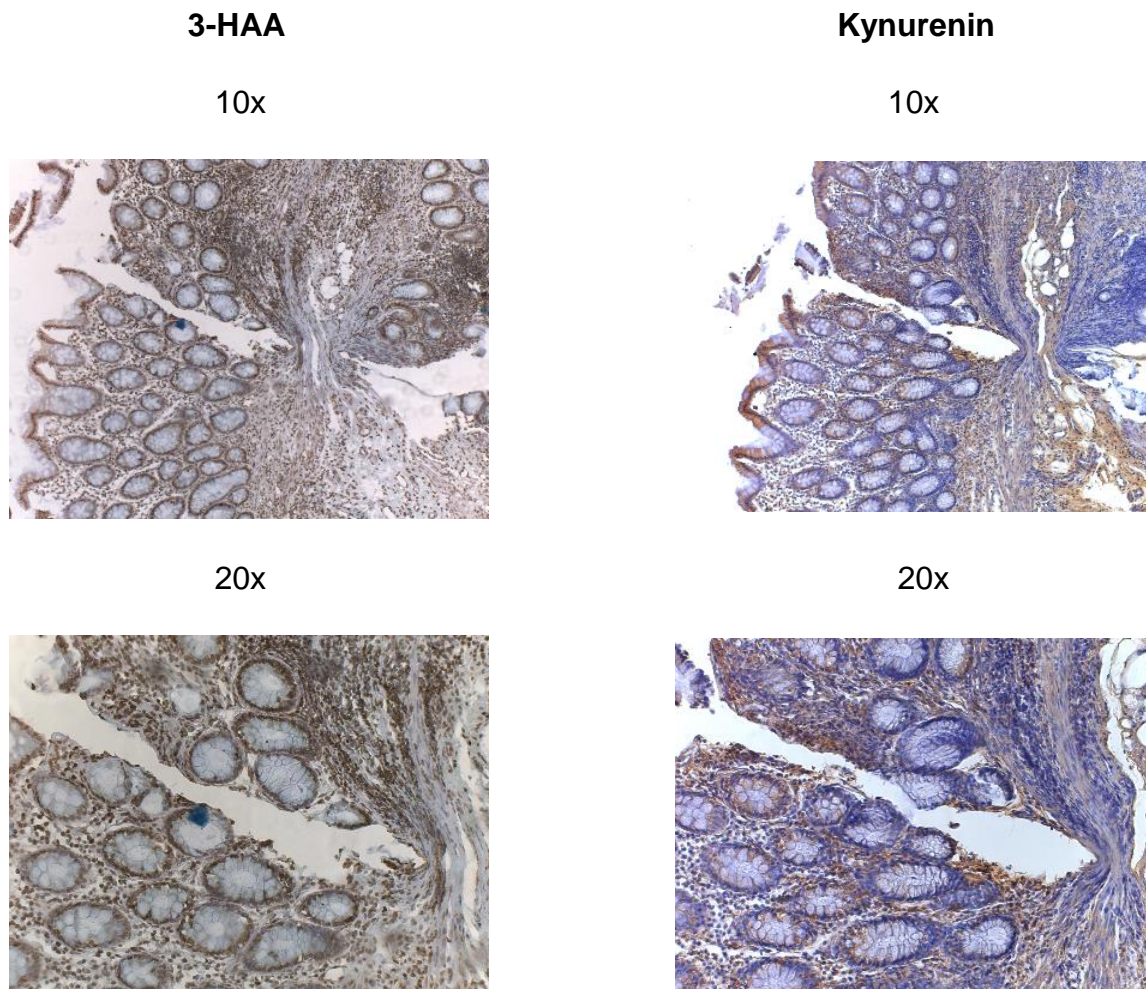


**Abbildung S2: Einfluss verschiedener Konzentrationen DSS auf das Gewicht von C57BL/6 Mäusen.** Das Trinkwasser von C57BL/6 Mäusen wurde 6 Tage mit zwei (1,5% oder 2,5 %) unterschiedlichen Konzentrationen DSS versetzt. Die Gabe erfolgte ad libitum. An Tag 6 erfolgte das Absetzen des DSS und die Gabe von Trinkwasser bis zum Versuchsende. Die Kontrolltiere erhielten über den gesamten Zeitraum normales Trinkwasser. An Tag 9 erfolgte die Probenentnahme und Probenaufarbeitung. Dargestellt ist der Gewichtsverlauf in % über 9 Tage. DSS = Dextransulfat-Natrium, Ktrl = Kontrolle



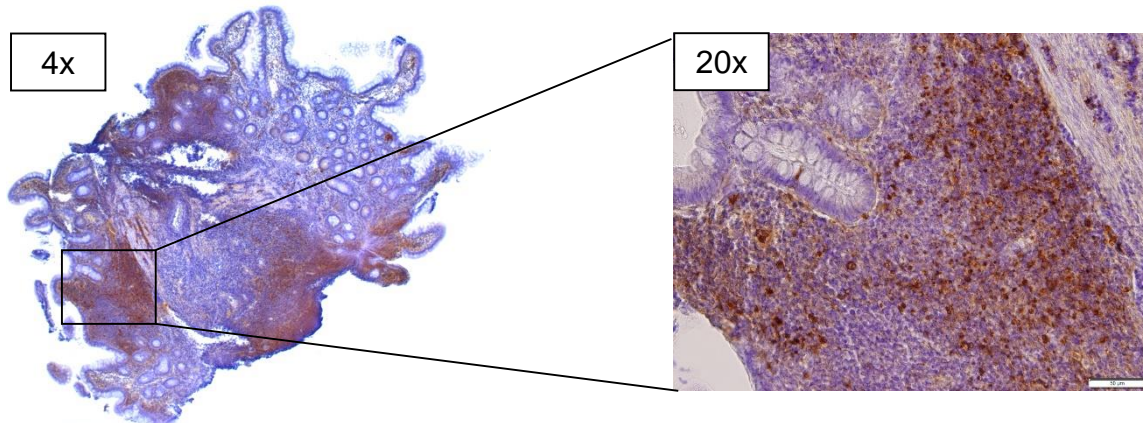
### 7.3 Erweitertes Material der immunhistochemischen-Analysen des lokalen Tryptophanstoffwechsels bei CED-Patienten im Schub

#### 7.3.1 Beispiel zur Anfertigung sequentieller immunhistochemischer-Färbungen



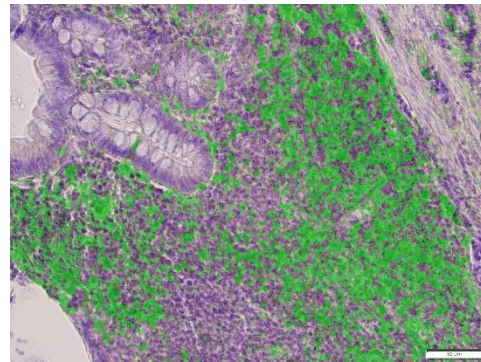
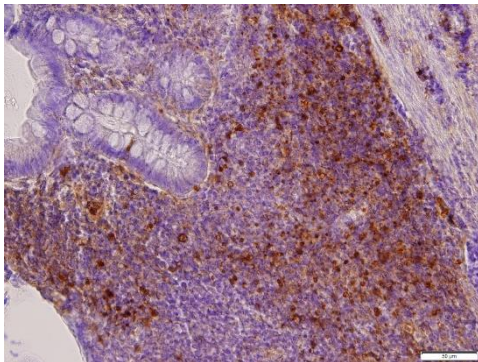
**Abbildung S3: Repräsentatives Beispiel der sequentiellen Analyse von intestinalen IHC-Färbungen.** Zu sehen sind zwei Färbungen der Detektion von 3-HAA und Kynurenin im gleichen Bereich eines CED-Patienten. Die Anfertigung der Schnitte erfolgte aufeinanderfolgend (sequentiell). Es wurde sichergestellt, dass 95% aller angefertigten Schnitte aus einer sequentiellen Vorgehensweise hervorgingen. Ausnahmen waren, wenn sich Schnitte während des Kochens vom Objektträger gelöst hatten oder es zu Rissen während des Schneideprozesses kam. 3-HAA = 3-Hydroxyanthranilsäure

### 7.3.2 Vorgehen zur Auswertung der immunhistochemischen-Färbungen



Gesamtfläche: 558391.14  $\mu\text{m}^2$

positive Fläche: 163.418  $\mu\text{m}^2$



$$\frac{163.418 \text{ (positive Fläche)}}{558391.14 \text{ (Gesamtfläche)}} \times 100 = 29.27 \%$$

**Abbildung S4: Repräsentative Indoleamin-2,3-Dioxygenase Färbung als Beispiel zur Auswertung der IHC-Färbungen.** Für die quantitative Auswertung wurde eine geeignete Region in einer 4x Vergrößerung identifiziert. Es erfolgte die Charakterisierung dieser Region anhand der aktiven Inflammation und die damit assoziierte Immunzellinfiltration in Übereinstimmung mit dem *Riley Score*. Die sequenziellen Analysen fanden in der 20x Vergrößerungen statt. Quantifiziert wurde mit Hilfe der *BZ Analyzer Software 9000* von Keyence. Nach der Programmierung der Software und der eindeutigen Identifizierung von positiven und negativen Zellen, berechnete die Software das Verhältnis von positiver Fläche (DAB positiv, braun) zur Gesamtfläche, wie oben dargestellt. Sowohl Immunzellen als auch Epithelzellen wurden in die Auswertung miteinbezogen. Flächen ohne Zellen (Hämatoxylin negativ) schloss das Programm von der Berechnung aus.

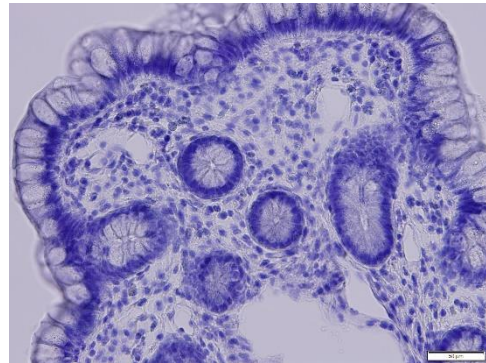
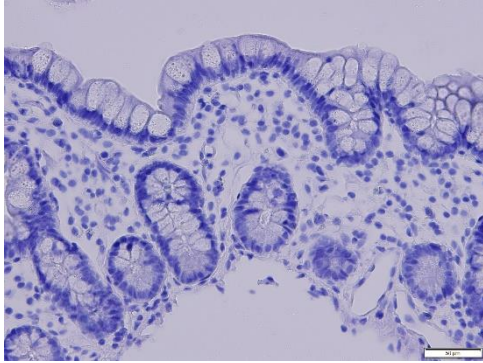


### 7.3.3 Negativkontrollen

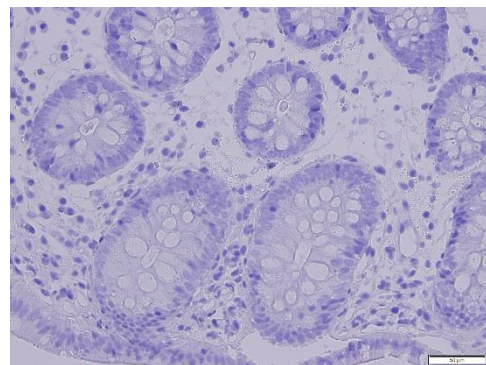
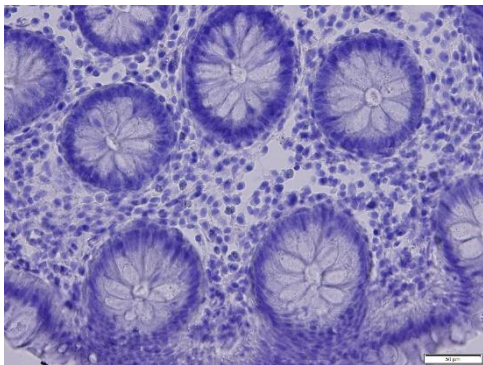
#### 2. Antikörper anti-Maus

#### 2. Antikörper anti-Kaninchen

#### Dünndarm (Ileum)



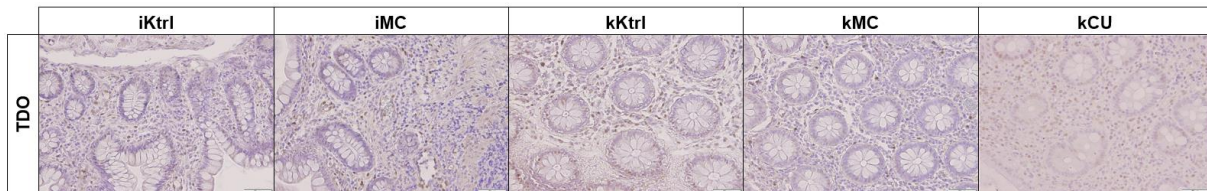
#### Dickdarm (Kolon)



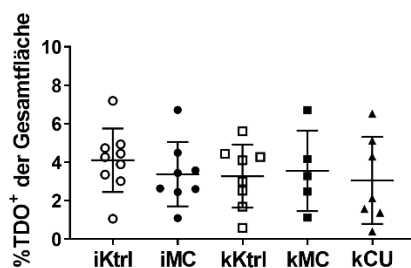
**Abbildung S5: Negativkontrollen der IHC-Färbungen.** Während allen seriellen IHC-Färbung wurden die komplementären 2. Antikörper ohne Beteiligung der 1. Antikörper mitgeführt, um mögliche unspezifische Bindungen zu identifizieren. Wie oben zu sehen, konnten unspezifische Bindungen der 2. Antikörper ausgeschlossen werden.

### 7.3.4 Immunhistochemische-Analyse der Tryptophan-2,3-Dioxygenase Proteinexpression in intestinalen Gewebeproben von CED-Patienten im Schub

A



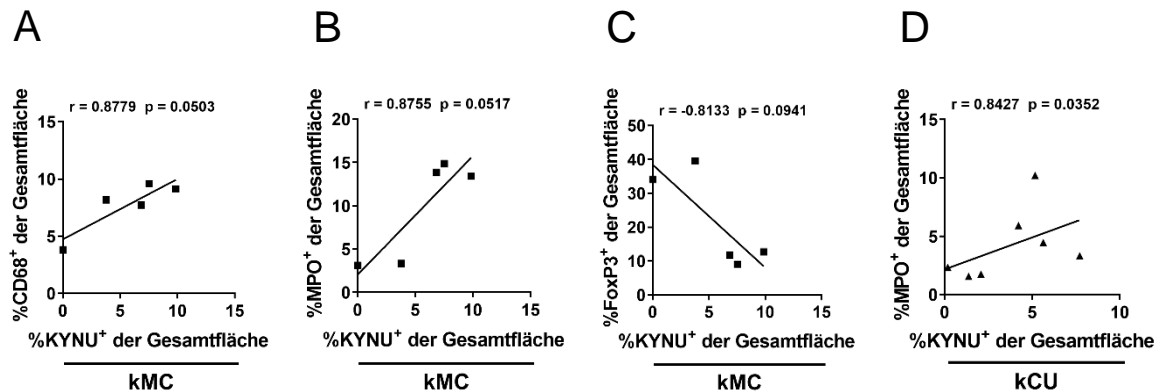
B



**Abbildung S6: IHC-Analyse zur Detektion von TDO in intestinalen Gewebeproben von CED-Patienten im Schub.** (A) Analyse der TDO Proteinexpressionen in FFPE Gewebeproben von MC und CU Patienten mittels IHC (repräsentative Bilder, Vergrößerung 20x). Der Vergleich von entzündetem Gewebe von MC und CU Patienten erfolgte sowohl miteinander als auch mit (nicht-entzündetem) gesundem Kontrollgewebe (Ktrl). Differenziell quantitative und lokalisationsabhängige Analyse des prozentualen (%) Anteiles an der Gesamtfläche von (B) TDO+ Zellen. Graphen dargestellt als Durchschnitt +/- SD von n = 4 – 8. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test. CED = chronisch-entzündliche Darmerkrankung, iKtrl = nicht-entzündetes Ileum-Kontrollgewebe, iMC = entzündetes Ileum-Gewebe von Morbus Crohn Patienten, kCU = entzündetes Kolon-Gewebe von Colitis ulcerosa Patienten, kKtrl = nicht-entzündetes Kolon-Kontrollgewebe, kMC = entzündetes Kolon-Gewebe von Morbus Crohn Patienten, TDO = Tryptophan-2,3-Dioxygenase

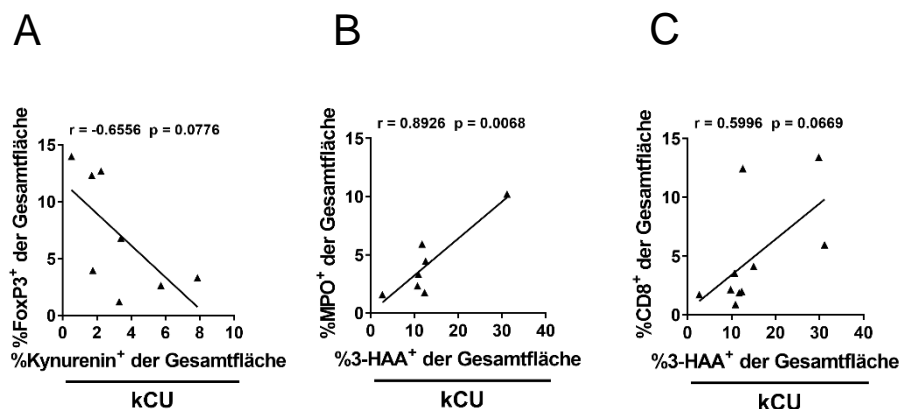
### 7.3.5 Korrelationen der immunhistochemischen-Analysen von Enzymen und Metaboliten des Tryptophanstoffwechsels sowie Immunzellmarkern der CED-Patientenkohorte-Bayreuth

#### 7.3.5.1 Enzyme versus Immunzellen



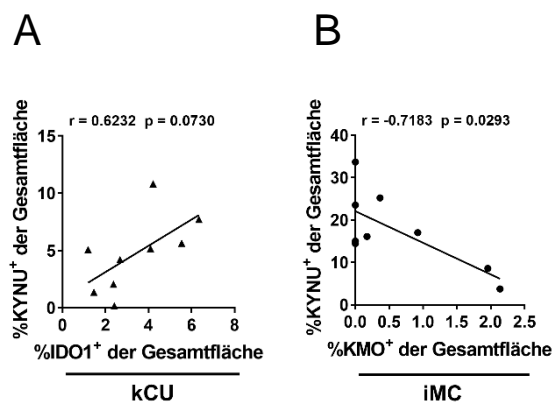
**Abbildung S7: Korrelationen zwischen Proteinenzymexpressionen des TRP-Stoffwechsels und infiltrierenden Immunzellen in intestinalen Gewebeproben von CED-Patienten im Schub.** KYNU Expression vs. (A) CD68, (B) MPO und (C) FoxP3 Expression in Gewebeproben von kMC Patienten. (D) KYNU Expression vs. MPO Expression in Gewebeproben von kCU Patienten. Für die statistische Analyse erfolgte die Bildung des Pearson's Korrelationskoeffizient von  $n = 5 - 7$ . Die Korrelationskoeffizienten ( $r$ ), sowie die Signifikanzen ( $p$ ) sind über den Graphen dargestellt. FoxP3 = *Forkhead-Box-Protein P3*, kCU = entzündetes Kolon-Gewebe von Colitis ulcerosa Patienten, kMC = entzündetes Kolon-Gewebe von Morbus Crohn Patienten, KYNU = Kynureninase, MPO = Myeloperoxidase, vs. = versus

#### 7.3.5.2 Metabolite versus Immunzellen



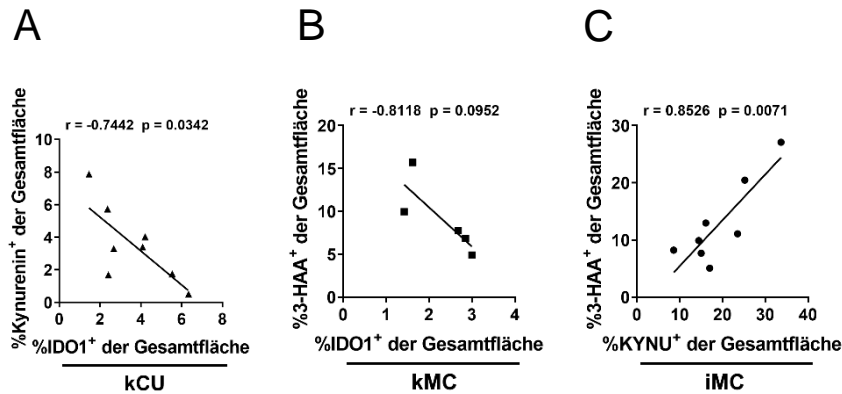
**Abbildung S8: Korrelationen zwischen TRP-Metaboliten und infiltrierenden Immunzellen in intestinalen Gewebeproben von CED-Patienten im Schub.** Kynurenin Niveau vs. (A) FoxP3 Expression in Gewebeproben von kCU Patienten. 3-HAA Niveau vs. (B) MPO und (C) CD8 Expression in Gewebeproben von kCU Patienten. Für die statistische Analyse erfolgte die Bildung des Pearson's Korrelationskoeffizient von  $n = 7 - 9$ . Die Korrelationskoeffizienten ( $r$ ), sowie die Signifikanzen ( $p$ ) sind über den Graphen dargestellt. 3-HAA = 3-Hydroxyanthranilsäure, CED = chronisch-entzündliche Darmerkrankung, FoxP3 = *Forkhead-Box-Protein P3*, kCU = entzündetes Kolon-Gewebe von Colitis ulcerosa Patienten, MPO = Myeloperoxidase, vs. = versus

### 7.3.5.3 Enzyme versus Enzyme



**Abbildung S9: Korrelationen zwischen der KYNU Proteinexpression und weiteren Enzymexpressionen des TRP-Stoffwechsels in intestinalen Gewebeproben von CED-Patienten im Schub.** (A) IDO1 Expression vs. KYNU Expression in Gewebeproben von kCU Patienten. (B) KMO Expression vs. KYNU Expression in Gewebeproben von iMC Patienten. Für die statistische Analyse erfolgte die Bildung des Pearson's Korrelationskoeffizient von  $n = 8 - 9$ . Die Korrelationskoeffizienten ( $r$ ), sowie die Signifikanzen ( $p$ ) sind über den Graphen dargestellt. CED = chronisch-entzündliche Darmerkrankung, iMC = entzündetes Ileum-Gewebe von Morbus Crohn Patienten, IDO1 = Indolamin-2,3-Dioxygenase 1, kCU = entzündetes Kolon-Gewebe von Colitis ulcerosa Patienten, KMO = Kynurenin-3-Monooxygenase, KYNU = Kynureninase, vs. = versus

### 7.3.5.4 Enzyme versus Metabolite



**Abbildung S10: Korrelationen zwischen Proteinenzymexpressionen und Metaboliten des TRP-Stoffwechsels in intestinalen Gewebeproben von CED-Patienten im Schub. (A)** IDO1 Expression vs. Kynurenin Niveau in Gewebeproben von kCU Patienten. **(B)** IDO1 Expression vs. 3-HAA Niveau in Gewebeproben von kMC Patienten. **(C)** KYNU Expression vs. 3-HAA Niveau in Gewebeproben von iMC Patienten. Für die statistische Analyse erfolgte die Bildung des Pearson's Korrelationskoeffizient von  $n = 5 - 8$ . Die Korrelationskoeffizienten ( $r$ ), sowie die Signifikanzen ( $p$ ) sind über den Graphen dargestellt. CED = chronisch-entzündliche Darmerkrankung, iMC = entzündetes Ileum-Gewebe von Morbus Crohn Patienten, IDO1 = Indolamin-2,3-Dioxygenase 1, kCU = entzündetes Kolon-Gewebe von Colitis ulcerosa Patienten, kMC = entzündetes Kolon-Gewebe von Morbus Crohn Patienten, KYNU = Kynureninase, vs. = versus

## 7.4 Erweitertes Einzelzellscreening: Zuordnung von entzündungsinduzierten Enzymexpressionen des TRP-Stoffwechsels zu Zelltypen des Immunsystems und des Epitheliums

### 7.4.1 M1 und M2 Makrophagen

**Tabelle S1: Übersicht der entzündungsinduzierte mRNA Expressionen von Enzymen des TRP-Stoffwechsels in M1 und M2 Makrophagen.**  $10^6$  M1 und M2 Makrophagen wurden für 24 Std. mit  $\text{IFN}\gamma$  (100 U/ml),  $\text{TNF}\alpha$  (100 ng/ml) und  $\text{IL-1}\beta$  (10 ng/ml) stimuliert. Die Analyse der mRNA erfolgte nach RNA Extraktion und cDNA-Synthese mittels TaqMan Real Time PCR. mRNA Expressionen dargestellt als x-fach zur unstimulierten Kontrolle von  $n = 3 - 5$ . Die statistische Auswertung erfolgte mit dem *paired students t-test*.  $p < 0,05$  = signifikant

Zusammenfassung der mRNA Enzymexpressionen in M1/M2 Makrophagen				
	basale Expression	Regulation	p Wert	x-fach zur unstimulierten Ktrl.
<b>M1 Makrophagen</b>				
IDO1	ja	Up	0.0051	183.6980
IDO2	ja	Up	0.0016	8.0360
TDO	nein	-	-	-
KAT1	ja	Down	n.s.	0.6066
KAT2	nein	-	-	-
KAT3	ja	Up	n.s.	2.4458
KMO	ja	Up	n.s.	2.1299
KYNU	ja	Up	0.0443	4.9092
3-HAAO	ja	Down	n.s.	0.9679
<b>M2 Makrophagen</b>				
IDO1	ja	Up	n.s.	41.3946
IDO2	ja	Up	0.0108	21.0556
KAT1	ja	Up	0.0086	2.5325
KAT2	ja	Up	n.s.	1.0785
KAT3	ja	Up	0.0049	2.9088
KMO	ja	Up	0.0332	2.4850
KYNU	ja	Up	0.0312	7.6158
3-HAAO	ja	Up	n.s.	1.2868

3-HAAO = 3-Hydroxyanthranilat-3,4-Dioxygenase, IDO1 = Indolamin-2,3-Dioxygenase 1,  
 IDO2 = Indolamin-2,3-Dioxygenase 2, KAT1 = Kynureninaminotransferase 1,



KAT2 = Kynureninaminotransferase 2, KAT3 = Kynureninaminotransferase 3, KMO = Kynurenin-3-Monooxygenase, Ktrl. = Kontrolle, KYNU = Kynureninase, TDO = Tryptophan-2,3-Dioxygenase

#### 7.4.2 T Zellen

**Tabelle S2: Übersicht der entzündungsinduzierten mRNA Expressionen von Enzymen des TRP-Stoffwechsels in T Zellen.**  $10^6$  CD3+ und CD8+ T Zellen wurden für 24 Std. mit  $\text{IFN}\gamma$  (100 U/ml),  $\text{TNF}\alpha$  (100 ng/ml) und IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) stimuliert. Die Analyse der mRNA erfolgte nach RNA Extraktion und cDNA-Synthese mittels TaqMan Real Time PCR. mRNA Expressionen dargestellt als x-fach zur unstimulierten Kontrolle von n = 3 - 5. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem *paired students t-test*.  $p < 0,05$  = signifikant

Zusammenfassung der mRNA Enzymexpressionen in T Zellen				
	basale Expression	Regulation	p Wert	x-fach zur unstimulierten Ktrl.
<b>CD3+ T Zellen</b>				
IDO1	nein	-	-	-
IDO2	nein	-	-	-
TDO	nein	-	-	-
KAT1	ja	Down	n.s.	0.8278
KAT2	nein	-	-	-
KAT3	ja	Up	n.s.	1.4485
KMO	nein	-	-	-
KYNU	nein	-	-	-
3-HAAO	nein	-	-	-
<b>CD8+ T Zellen</b>				
IDO1	nein	-	-	-
IDO2	nein	-	-	-
TDO	nein	-	-	-
KAT1	ja	Down	n.s.	0.9870
KAT2	nein	-	-	-
KAT3	nein	-	-	-
KMO	nein	-	-	-
KYNU	nein	-	-	-

3-HAAO	nein	-	-	-
--------	------	---	---	---

3-HAAO = 3-Hydroxyanthranilat-3,4-Dioxygenase, IDO1 = Indolamin-2,3-Dioxygenase 1,  
 IDO2 = Indolamin-2,3-Dioxygenase 2, KAT1 = Kynureninaminotransferase 1,  
 KAT2 = Kynureninaminotransferase 2, KAT3 = Kynureninaminotransferase 3,  
 KMO = Kynurenin-3.-Monooxygenase, Ktrl. = Kontrolle, KYNU = Kynureninase, TDO = Tryptophan-2,3-Dioxygenase

## 8. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
3-HAA	3-Hydroxyanthranilsäure
3-HAAO	3-Hydroxyanthranilsäure-3,4-Dioxygenase
3-OH-Kyn	3-Hydroxykynurenine
AA	Anthranilsäure
ACTB	β-Aktin
AhR	Aryhydrocarbonrezeptor
APC	Antigenpräsentierende Zellen
ASCA	<i>anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CA	Cinnabarinsäure
CAC	<i>Colitis-associated cancer</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDEIS	<i>Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity</i>
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRP	C-reaktives Protein
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein-4</i>
CU	Colitis ulcerosa
DAB	Diaminobenzidin
DAMP	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DAPI	4',6-Diamididin-2-phenylindol

DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSS	Dextransulfat-Natrium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FFPE	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
FoxP3	<i>Forkhead-box-protein P3</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCN2	<i>General Control Nonderepressible 2</i>
GI	Gastrointestinal
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GPR35	<i>G protein-coupled receptor 35</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HBI	<i>Harvey-Bradshaw Index</i>
HEPES	Hydroxyethylpiperazinylethanosulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
iCCC	Interdisziplinäres Crohn Colitis Centrum
IDO1	Indolamin-2,3-Dioxygenase 1
IDO2	Indolamin-2,3-Dioxygenase 2
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferonen

IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
iMC	Ileum-assoziiierter Morbus Crohn
Inflamm	Inflammationscocktail
Iono	Ionomycin
KAT	Kynureninaminotransferase
KCL	Kaliumchlorid
kCU	Kolon-assoziierte Colitis ulcerosa
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
KM	Michealis-Menten-Kinetik
kMC	Kolon-assoziiierter Mobus Crohn
KMO	Kynurenin-3-Monooxygenase
Ktrl	Kontrolle
Kyn	Kynurenin
KynA	Kynureninsäure
KYNU	Kynureninase
LC-MS/MS	Liquid-Chromatographie Massenspektrometrie/ Massenspektrometrie
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MC	Morbus Crohn
min	Minute
MMP2	Matrix-Metalloproteinase-2
MPO	Myeloperoxidase

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NF $\kappa$ B	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NH <sub>4</sub>	Ammonium
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomäne
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
pANCA	<i>Perinuclear antineutrophil cytoplasmatic antibodies</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD-1	<i>Programmed Cell Death Protein-1</i>
PDK1	Phosphoinositid-abhängige Kinase-1
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMN	Polymorphkernige Zellen
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
qRT-PCR	Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion
QuinA	Quinolinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPL13a	Ribosomal Protein L13a
RT	Raumtemperatur

SCCAI	<i>Simple Colitis Clinical Activity Index</i>
Sek	Sekunde
SES-CD	<i>Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease</i>
SD	Standardabweichung
Std.	Stunde
TDO	Tryptophan-2,3-Dioxygenase
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TH	T Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatorische T Zelle
TRP	Tryptophan
TZC	T Zell Cocktail
u.a.	unter anderem
UCT	Universitäres Centrum für Tumorerkrankungen
ZFE	Zentrale Forschungseinrichtung

## 9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Pathophysiologie bei (A) Colitis ulcerosa und (B) Morbus Crohn.....	9
Abbildung 2	Montreal Klassifizierung bei Morbus Crohn.....	11
Abbildung 3	Subtypen von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sowie die dazugehörigen Diagnosen dargestellt mit klinischen, endoskopischen und (histo-) pathologischen Merkmalen.....	12
Abbildung 4	Schema des Tryptophanstoffwechsels zur Produktion von Nikotinamidadenindinukleotid über Kynurenin.....	22
Abbildung 5	Analyse von TRP und TRP-Metaboliten in Blutplasmaproben von CED-Patienten in Remission.....	63
Abbildung 6	Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen DSS auf Gewicht, Stuhlkonsistenz und Länge der Darmabschnitte von C57BL/6 Mäusen.....	65
Abbildung 7	Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen DSS auf die Blutplasmakonzentrationen von Kynurenin und 3-HAA von C57BL/6 Mäusen.....	67
Abbildung 8	IHC-Analysen zur Detektion von infiltrierenden Antigenpräsentierenden Zellen in intestinalen Gewebeproben von CED-Patienten mit aktiver Inflammation.....	71
Abbildung 9	IHC-Analysen zur Detektion von infiltrierenden Neutrophilen Granulozyten in intestinalen Gewebeproben von CED-Patienten mit aktiver Inflammation.....	72
Abbildung 10	IHC-Analysen zur Detektion von infiltrierenden T Zellen in intestinalen Gewebeproben von CED-Patienten mit aktiver Inflammation.....	74



Abbildung 11	IHC-Analysen zur Detektion von Enzymen des TRP-Stoffwechsels in intestinalen Gewebeproben von CED-Patienten mit aktiver Inflammation.....	78
Abbildung 12	IHC-Analysen zur Detektion von Kynurenin und 3-HAA in intestinalen Gewebeproben von CED-Patienten mit aktiver Inflammation.....	80
Abbildung 13	Überblick des lokalen intestinalen TRP-Stoffwechsels bei iMC...	81
Abbildung 14	Schematische Darstellung zur Unterscheidung von iMC, kMC und kCU mittels IHC-basierter Kombinatorik des intestinalen TRP-Stoffwechsels.....	83
Abbildung 15	Analyse der entzündungsinduzierten mRNA Enzymexpressionen des TRP Stoffwechsels in Antigenpräsentierenden Zellen mittels qRTPCR.....	87
Abbildung 16	Analyse der entzündungsinduzierten IDO1 und KYNU mRNA Expressionen in M1 und M2 Makrophagen mittels qRTPCR.....	88
Abbildung 17	Entzündungsinduzierte Kynurenin und 3-HAA Produktion durch M1 und M2 Makrophagen via LC-MS/MS.....	89
Abbildung 18	Analyse der entzündungsinduzierten mRNA Enzymexpressionen des TRP-Stoffwechsels in intestinalen Epithelzellen mittels qRTPCR.....	91
Abbildung 19	Entzündungsinduzierte Kynurenin Produktion durch die intestinalen Zelllinien CCD 841 CoN, CaCo-2 und DLD-1 via LC-MS/MS.....	93
Abbildung 20	Analyse der systemischen und lokalen IDO1 Proteinexpression in T Zellen mittels FACS und Immunfluoreszenz.....	95
Abbildung 21	Entzündungsinduzierte mRNA Expression von AhR in T Zellen.....	97

Abbildung 22	Schema zum deregulierten TRP-Stoffwechsel bei Ileum-assoziiertem Morbus Crohn.....	111
Abbildung S1	Konzentrationsbestimmung von TRP, Kyn und KynA in Urin- und Stuhlproben mittels ELISA.....	144
Abbildung S2	Einfluss verschiedener Konzentrationen DSS auf das Gewicht von C57BL/6 Mäusen.....	145
Abbildung S3	Repräsentatives Beispiel der sequentiellen Analyse von intestinalen IHC-Färbungen.....	146
Abbildung S4	Repräsentative Indoleamin-2,3-Dioxygenase Färbung als Beispiel zur Auswertung der IHC-Färbungen.....	147
Abbildung S5	Negativkontrollen der IHC-Färbungen.....	148
Abbildung S6	IHC-Analyse zur Detektion von TDO in intestinalen Gewebeproben von CED-Patienten im Schub.....	149
Abbildung S7	Korrelationen zwischen Proteinenzymexpressionen des TRP-Stoffwechsels und infiltrierenden Immunzellen in intestinalen Gewebeproben von CED-Patienten im Schub.....	150
Abbildung S8	Korrelationen zwischen TRP-Metaboliten und infiltrierenden Immunzellen in intestinalen Gewebeproben von CED-Patienten im Schub.....	150
Abbildung S9	Korrelationen zwischen der KYNU Proteinexpression und weiteren Enzymexpressionen des TRP-Stoffwechsels in intestinalen Gewebeproben von CED-Patienten im Schub.....	151
Abbildung S10	Korrelationen zwischen Proteinenzymexpressionen und Metaboliten des TRP-Stoffwechsels in intestinalen Gewebeproben von CED-Patienten im Schub.....	152

## 10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Überblick der klinischen, endoskopischen und histologischen Scores bei chronisch-entzündlichen Darm-erkrankungen.....	14
Tabelle 2	Antikörper.....	33
Tabelle 3	Interleukine und Stimulanzen.....	35
Tabelle 4	Kits.....	35
Tabelle 5	TaqMan Sonden für die quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR).....	36
Tabelle 6	Auflistung der Zellkulturmedien für die primären Immunzellen und intestinale Zelllinien.....	37
Tabelle 7	Auflistung der eingesetzten Puffer.....	37
Tabelle 8	Auflistung der eingesetzten Chemikalien.....	38
Tabelle 9	Laborgeräte.....	39
Tabelle 10	Software.....	40
Tabelle 11	Verdünnungen der Erstantikörper für IHC-Analysen.....	47
Tabelle 12	Reaktionsgemisch zur Herstellung von komplementärer DNA aus RNA.....	56
Tabelle 13	Programm der Reversen Transkription zur Synthese von komplementärer DNA.....	56
Tabelle 14	Reaktionsgemisch für die Anwendung der qRT-PCR.....	57
Tabelle 15	qRT-PCR Programm.....	57
Tabelle 16	Klinische Charakteristika der CED-Patientenkohorte-Frankfurt.....	61
Tabelle 17	Klinische Charakteristika der CED-Patientenkohorten-Bayreuth und Ursprung der Gewebeproben.....	69

Tabelle 18	Zusammenfassung des intestinalen immunologischen Profils von CED-Subtypen.....	76
Tabelle S1	Übersicht der entzündungsinduzierte mRNA Expressionen von Enzymen des TRP-Stoffwechsels in M1 und M2 Makrophagen.....	153
Tabelle S2	Übersicht der entzündungsinduzierten mRNA Expressionen von Enzymen des TRP-Stoffwechsels in T Zellen.....	154

## 11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Heinfried H. Radeke für die Bereitstellung der äußerst interessanten und spannenden Aufgabenstellung, die motivierenden und konstruktiven Anregungen und den Freiraum bei der Ausgestaltung des Projektes bedanken

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Kollegen und Freunden aus der Arbeitsgruppe für die tolle Arbeitsatmosphäre, die ständige Hilfsbereitschaft, die persönliche Unterstützung und vieles mehr. Frau Martina Herrero San Juan möchte ich an dieser Stelle nochmals erwähnen, da ihre wissenschaftliche aber auch menschliche und herzliche Art einen wesentlichen Anteil an dieser Arbeit hatte.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Joseph M. Pfeilschifter für das stete Interesse an dieser Arbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre am *pharmazentrum frankfurt*.

Prof. Beatrix Süß möchte ich ganz herzlich für die Betreuung seitens der biowissenschaftlichen Fakultät bedanken, ferner aber auch für Ihr Interesse an der Thematik dieser Arbeit und Ihrer Tätigkeit als Prüferin und Gutachterin.

Danken möchte ich des Weiteren Prof. Michael Vieth und Prof. Jürgen Stein für die Bereitstellung und Befundung der humanen Proben, dem großen Interesse an meiner Arbeit sowie Vielfältigen Unterstützung bei den immunologischen Analysen.

Ebenso gilt mein Dank Prof. Urs Christen, PD Edith Hintermann, PD Andreas Weigert, PD Eva Henykova, Prof. Philipp Weller, Katrin Bankov, Janet Collins und Riad Haceni für die apparative und persönliche Unterstützung sowie für den wissenschaftlichen Austausch.

Die vorliegende Arbeit wäre ohne die finanzielle Unterstützung des Bundesministeriums für Wirtschaft und Energie (BMWi) nicht möglich gewesen. Ich möchte mich daher repräsentativ bei dem Initiator dieses Projektes Herrn Dr. Karl-Heinz Kellner bedanken. Nicht nur für den wissenschaftlichen Austausch, sondern

auch für die stehst freundliche und zwischenmenschliche Basis die sich innerhalb der letzten drei Jahre zwischen uns entwickelt hat.

Frau Dr. Brigitte Held organisierte mit viel Freude und Einsatz das Programm der *Frankfurt International Research Graduate School for Translational Biomedicine* (FIRST). Ich möchte ihr hierfür danken, da sie mir die vielfältigen Karrieremöglichkeiten nach der Promotion offengelegt und somit entscheidend auf meinen zukünftigen Berufsweg Einfluss genommen hat.

Mein größter Dank gebührt schließlich meiner Familie, meiner Freundin Steffi sowie meinen Freunden, die mir immer mit Rat und Tat beiseite gestanden haben.

## 12. Publikationen und Konferenzteilnahmen

### 12.1 Publikationen

**Huhn M**, Herrero San Juan M, Melchert B, Dreis C, Schmidt KG, Schwiebs A, Collins J, Pfeilschifter JM, Vieth M, Stein J, Radeke HH. Inflammation induced mucosal KYN expression identifies human ileal Crohn's disease. *J Clin Med*. 2020 May

Schmidt KG, Nordin A, Trautmann S, Wagner A, Ottenlinger F, Thomas D, Schwiebs A, Dreis C, **Huhn M**, Ackermann H, Larsson A, Pfeilschifter J, Jakobsson PJ, Radeke HH. Activity-dependent stratification of SSc patients unravels new markers of disease progression at the endothelial - platelet interface. *J Clin Med*. (in revision)

Dreis C, Ottenlinger FM, Putyrski M, Ernst A, **Huhn M**, Schmidt KG, Pfeilschifter JM, Radeke HH. Tissue Cytokine IL-33 Modulates the Cytotoxic CD8 T Lymphocyte Activity During Nutrient Deprivation by Regulation of Lineage Specific Differentiation Programs. *Front Immunol*. 2019 Jul;24;10:1698

Hinrichsen I, Weißbecher IM, **Huhn M**, Passmann S, Zeuzem S, Plotz G, Biondi RM, Brieger A. Phosphorylation-dependent signaling controls degradation of DNA mismatch repair protein PMS2. *Mol Carcinog*. 2017 Dec;56(12):2663-2668

### 12.2 Konferenzteilnahmen

#### 15th Congress of European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO, Wien)

Identification of the tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid as a novel tool for the differentiation of Crohn's disease phenotypes (Poster), 12. – 15.02.2020

#### 74. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen (DGVS, Wiesbaden)

Intestinaler Tryptophan Metabolismus bei CED (Präsentation), 02. - 05.10.2019

#### 73. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen (DGVS, München)

Tryptophan Metabolismus bei CED – Biomarker für Inflammation und Karzinogenese (Präsentation), 12. - 15.09.2018

**5th European Congress of Immunology (ECI, Amsterdam)**

Tryptophan metabolism in inflammatory bowel disease – Distribution and regulation of enzymes, metabolites and target structures in a multidimensional model (Poster), 02. – 05.09.2018

**31. Jahrestagung der deutschen Arbeitsgemeinschaft für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (DACED, Mainz)**

Tryptophan metabolism in IBD – Biomarker for Inflammation and Carcinogenesis, 15. – 16.06.2018



### 13. Curriculum Vitae

#### Persönliche Daten

---

Name	Meik Huhn
Adresse	Amtsgasse 19 64832 Babenhausen
Geburtsdatum / -ort	02.01.1991 in Dieburg, Deutschland

---

#### Ausbildung

---

01/2017 – 09/2020	Promotion zum Dr. rer. nat. am Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Frankfurt am Main, Deutschland  Arbeitsgruppe: Immunpharmakologie  Arbeitsgruppenleiter: Prof. Dr. Heinfried H. Radeke  Förderung durch das Bundesministerium für Wirtschaft und Energie (BMWi) sowie das Zentrale Innovationsprogramm Mittelstand (ZIM)
10/2014 – 10/2016	Masterstudium Molekulare Medizin (M.Sc.) an der Goethe Universität Frankfurt am Main, Deutschland  Masterarbeit an der Medizinischen Klinik 1: Gastroenterologie und Hepatologie des Universitätsklinikums Frankfurt am Main, Deutschland  Arbeitsgruppenleiterin: PD Dr. Angela Brieger
10/2011 – 10/2014	Bachelorstudium Biochemie (B.Sc.) an der Goethe Universität Frankfurt am Main, Deutschland  Bachelorarbeit am Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Frankfurt am Main, Deutschland

Arbeitsgruppenleiter: PD Dr. Richard Zehner

---

08/2007 – 06/2010      Abitur an der Landrat-Gruber-Schule in Dieburg,  
Deutschland

---

Darmstadt, den

---

Meik Huhn

## **14. Schriftliche Erklärung**

### **Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den

---

Meik Huhn